



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
DOUTORADO EM NEUROLOGIA

LEONARDO BORGES MURAD

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE ALFA-TOCOFEROL PRESERVA A RESPOSTA
NEUROLÓGICA E REVERTE OS EFEITOS DELETÉRIOS DA INIBIÇÃO
DAS ISOFORMAS CONSTITUTIVAS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS PROPENSOS
AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

RIO DE JANEIRO
2011

LEONARDO BORGES MURAD

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE ALFA-TOCOFEROL PRESERVA A RESPOSTA
NEUROLÓGICA E REVERTE OS EFEITOS DELETÉRIOS DA INIBIÇÃO
DAS ISOFORMAS CONSTITUTIVAS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS PROPENSOS
AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Marques
Alves Vianna

RIO DE JANEIRO
2011

Murad, Leonardo Borges.

M972 Suplementação crônica de alfa-tocoferol preserva a resposta neurológica e reverte os efeitos deletérios da inibição das isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase em ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico / Leonardo Borges Murad, 2011.
127f.

Orientador: Lucia Marques Alves Vianna.

Tese (Doutorado em Neurologia) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

1. Acidente cerebral vascular. 2. Alfa-tocoferol. 3. SHRSP. 4. Pressão arterial sistólica. 5. Memória (Neurologia). I. Vianna, Lucia Marques Alves. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Curso de Doutorado em Neurologia. III. Título.

CDD – 616.81

LEONARDO BORGES MURAD

SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE ALFA-TOCOFEROL PRESERVA A RESPOSTA NEUROLÓGICA E REVERTE OS EFEITOS DELETÉRIOS DA INIBIÇÃO DAS ISOFORMAS CONSTITUTIVAS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS PROPENSOS AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lucia Marques Alves Vianna
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Regina Maria Papais Alvarenga
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Cláudio Alberto Serfaty
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Jean-Christophe Houzel
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

DEDICATÓRIA

A todos que me incentivaram e apoiaram durante os todos os árduos anos de profunda concentração e estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me permitido atingir minhas metas acadêmicas e pessoais. Aos meus pais, Paulo e Rita, ao meu irmão, Alexandre e a minha namorada, Luana Dalbem pelo suporte, dedicação, amor e compreensão em momentos difíceis. Aos meus grandes amigos, Gustavo, Filipe e Leonardo que me ajudaram a superar grandes obstáculos e sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço também a todos os amigos do laboratório, em especial à Marcela Guimarães, por todo seu suporte, amizade e entrega no desenvolvimento da pesquisa.

À Camille França, Victor Agati e as alunas de Iniciação Científica pelo apoio técnico-científico e companheirismo no cotidiano laboratorial.

À todos meus colegas do Instituto Nacional de Câncer, pelos momentos de enriquecimento técnico e alegria em minha vida laboral.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira, que com sua vasta experiência na vida acadêmico-científica guiou meus passos na confecção desta tese.

À Professora Dra. Regina Maria Papais Alvarenga, por todo seu idealismo e perseverança na construção de um curso de Pós-Graduação Stricto Sensu de tão alta qualidade.

E finalizando meus agradecimentos, dirijo minha imensa gratidão, apreço, respeito e carinho à minha orientadora, Professora Dra Lucia Marques Vianna, que iluminou meu caminho científico com sua sabedoria e conhecimento.

À todos o meu sincero Obrigado.

“Nous parlons avec l'hémisphère gauche”

(Pierre Paul Broca, 1864)

RESUMO

As doenças cerebrovasculares são a segunda maior causa de morte e demência, e a causa principal de incapacidade no mundo. Na classificação por gênero, são a terceira causa de mortes em homens, depois da isquemia cardíaca e do câncer de pulmão. Nas mulheres são as causas primárias de morte. Estudos indicaram que as funções mais comumente envolvidas, em lesões cerebrovasculares, parecem ser aquelas associadas com a memória e função executiva. Em relação aos fatores de risco, estudos apontam a idade, fumo, diabetes, colesterol e pressão arterial sistólica como os maiores fatores de risco relacionados ao AVE. Outros autores citam o fibrinogênio, o fator VII, e o fator VIII de coagulação como associados a doenças vasculares, incluindo o AVE. Contudo, existem fortes evidências da implicação do estresse oxidativo na etiopatogenia das disfunções vasculares em geral. Neste aspecto, o vitâmero da vitamina E, denominado alfa-tocoferol, se destaca por apresentar efeitos benéficos relacionados à propriedade antioxidante. As ações fisiológicas benéficas desta vitamina podem estar associadas com a capacidade desta de induzir a disponibilidade endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS). Curiosamente, diversos fatores de risco do AVE têm envolvimento direto com o metabolismo do óxido nítrico e esta molécula parece desempenhar um papel fundamental na formação da memória. Entretanto, estudos relatam prejuízo na função da memória, aumento de pressão arterial e ineficácia no controle oxidativo em modelos animais e seres humanos tratados com Vitamina E. Estes resultados controversos estimulam a realização de pesquisas com os objetivos de esclarecer a influência do alfa-tocoferol na preservação da resposta neurológica e no controle dos fatores de risco do AVE e determinar se esta vitamina possui efeitos protetores durante a inibição crônica do óxido nítrico. Assim 24 ratos machos, da linhagem SHRSP, pesando entre 195-230g, com 15 semanas de vida, foram subdivididos em 4 grupos: grupo Alfa-tocoferol, grupo Controle, grupo L-NAME e grupo Alfa-tocoferol+L-NAME (n=6, cada). Os grupos tratados com alfa-tocoferol receberam 120UI de alfa-tocoferol diluído em 0,1ml de óleo de coco, e os que tiveram administrado o L-NAME receberam 10mg/kg/peso ao dia diluído no bebedouro. Os ratos controles apenas receberam o veículo. A administração das drogas foi realizada por gavagem via orogástrica e o experimento durou 4 semanas. Estes grupos foram avaliados quanto aos parâmetros biológicos (peso, diurese, ingestão

de água e ração), pressóricos, oxidativos (avaliação do malondialdeído sanguíneo), coagulatórios (mensuração do fibrinogênio e da contagem de plaquetas) e inflamatórios (lactato desidrogenase - LDH), além de testados em um extenso protocolo neurológico visando observar a condição sensório-motora e a preservação da memória. Ao final do experimento o cérebro foi removido para a avaliação histopatológica e avaliação de proliferação celular. Na análise dos dados, utilizou-se o teste ANOVA one-way ($p < 0,05$ foi considerado significativo), a distribuição de frequência para os testes de escore e o índice de discriminação para avaliação da preservação da memória. Os resultados indicaram redução do estresse oxidativo pela diminuição significativa do malondialdeído nos grupos tratados com alfa-tocoferol, concomitantemente houve redução da pressão arterial sistólica e modulação nos níveis de fibrinogênio, LDH e contagem de plaquetas. Os escores dos testes sensório-motores também apontaram para a manutenção da capacidade motora de animais tratados com alfa-tocoferol e a recuperação dos animais do grupo Alfa-tocoferol+L-NAME. Os testes de memória também demonstraram preservação do processo formador da memória nos grupos que receberam a suplementação com alfa-tocoferol. Em contraste, o grupo L-NAME apresentou os efeitos deletérios da administração deste inibidor da óxido nítrico sintase endotelial em todos os parâmetros estudados, excetuando os parâmetros biológicos. Este grupo ainda demonstrou significativo prejuízo na função de memória e importante déficit sensório-motor. Por sua vez, o exame histopatológico indicou proteção estrutural do tecido cerebral em animais tratados com alfa-tocoferol, e injúria das estruturas cerebrais no grupo L-NAME. Foi constatado aumento do número de células nos animais tratados com alfa-tocoferol, no entanto, no grupo L-NAME foi observada redução do número de células do hipocampo, com destaque para as sub-regiões CA1 e CA3. Em adição, não houve alteração nos parâmetros biológicos em nenhum dos grupos testados. As ações do alfa-tocoferol apresentadas nesta tese e a literatura do assunto indicam que a função antioxidante pode modular as atividades que geram a neuroproteção. Em conclusão, o alfa-tocoferol pode ser considerado um modulador dos fatores de risco do AVE e um agente neuroprotetor com função de preservação das estruturas e funções cerebrais.

Palavras-chave: Alfa-tocoferol. SHRSP. AVE. Pressão Arterial Sistólica. Memória.

ABSTRACT

Cerebrovascular diseases (CVD) are the second leading cause of death and dementia, and the main cause of disability in worldwide. In the classification by gender, CVD are the third leading cause of death in men, after ischemic heart disease and lung cancer. In women CVD are the primary causes of death. Studies have indicated that the functions most commonly involved in cerebrovascular lesions appear to be those associated with memory and executive functions. Regarding risk factors, studies pointed to age, smoking, diabetes, cholesterol and systolic blood pressure as major risk factors related to stroke. Others authors cited fibrinogen and clotting factor VII and VIII to be associated with vascular diseases, including stroke. However, there is strong evidence of the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of vascular disorders in general. In this respect, the isomer of vitamin E called alpha-tocopherol, stands out for having beneficial effects related to an antioxidant properties. The beneficial physiological actions of this vitamin may be associated with the ability to induce the availability of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Interestingly, several risk factors for stroke have direct involvement with the metabolism of nitric oxide and this molecule appears to play a key role in the memory formation. Nevertheless, studies report impairment in memory function, increase in blood pressure and ineffective control of oxidative stress in animal models and humans treated with vitamin E. These controversial results stimulate research with objectives of clarifying the alpha-tocopherol influence on the neurological response preservation and on the stroke risk factors control and determinate whether this vitamin has protective effects during chronic inhibition of nitric oxide. Thus 24 male rats, SHRSP strain, weighting 195-230g, 15 weeks old, were divided into four groups: alpha-tocopherol group, the control group, L-NAME group and alpha-tocopherol + L-NAME group (n = 6, each). The groups treated with alpha-tocopherol were supplemented with 120IU of alpha-tocopherol diluted in 0.1 ml of coconut oil, and the animals treated with L-NAME received 10mg/kg/weight *per* day diluted in drinking water. Control rats received only the vehicle. Supplementation was performed via orogastric gavage and the experiment during 4 weeks. These groups were assessed for biological parameters (weight, diuresis, water and food intake), blood pressure oxidative (measurement of blood malondialdehyde) coagulant (measurement of fibrinogen and platelet count),

and inflammatory (lactate dehydrogenase - LDH) also tested in an extensive neurological protocol aiming to observe the condition sensory-motor and memory preservation. At the end of the experiment the brain was removed for histopathological evaluation and assessment of cell proliferation. For data analysis, we used the test one-way ANOVA ($p < 0.05$ was considered significant), the frequency distribution for the test score and the index of discrimination to assess memory preservation. The results indicated a decrease in oxidative stress by the significant decrease of malondialdehyde in the groups treated with alpha-tocopherol, as well as concomitant reduction in systolic blood pressure and a modulation in levels of fibrinogen, LDH and platelet count. Sensory-motor test scores also pointed to maintaining of the motor capacity of treated animals with alpha-tocopherol and a recovery in animals of the Alpha-tocopherol + L-NAME group. Tests of memory also demonstrated the preservation on the memory formation process in groups receiving alpha-tocopherol supplemented. In contrast, L-NAME group presented deleterious effects in all parameters studied, except biological parameters. This group did demonstrate significant impaired memory function and an important sensory-motor deficit. The histopathological analysis indicated structural protection on the brain tissue in animals treated with alpha-tocopherol and brain structural injury of L-NAME group. It has been found increased numbers of cells in animals treated with alpha-tocopherol, however, the L-NAME group was a decrease in the number of cells in the hippocampus, especially the sub-regions CA1 and CA3. In addition, there was no change in biological parameters in any group tested. The actions of alpha-tocopherol presented in this thesis indicate that antioxidant function can modulate several activities generating vasoprotection and neuroprotection. In conclusion, alpha-tocopherol may be considered a stroke risk factor modulator and a neuroprotector agent with preservation of brain structures and functions.

Keywords: Alpha-tocopherol. SHRSP. Stroke. Systolic Blood Pressure. Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma esquemático do mecanismo de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009)	26
Figura 2	Representação gráfica do mecanismo intrínseco de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009)	26
Figura 3	Representação gráfica do mecanismo extrínseco de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009)	27
Figura 4	Rato SHRSP	37
Figura 5	Formação de espécies reativas de oxigênio	40
Figura 6	Fluxograma esquemático do dano celular pelo estresse oxidativo (Retirado de Fillipin et al., 2008)	42
Figura 7	Representação esquemática do mecanismo de ação do NO atuando como neurotransmissor (Retirado de Barreto, Correia e Muscara, 2005)	45
Figura 8	Representação química do N-Nitro L-Arginina metil-éster hidrocloreídrico	47
Figura 9	Representação química dos isômeros da Vitamina E (Modificado de Traber e Atkinson, 2007)	50
Figura 10	Representação gráfica da localização do alfa-tocoferol na membrana plasmática (Modificado de Atkinson et al., 2010)	52
Figura 11	Representação química da peroxidação lipídica e neutralização pelo alfa-tocoferol. Peroxidação lipídica e formação do radical lipídico (reação I); reação com o oxigênio e restauração do radical peroxila lipídico - “início da reação em cadeia” (reação II); neutralização do radical peroxila lipídico pelo alfa-tocoferol (reação III); reciclagem do alfa-tocoferol pela forma reduzida da coenzima Q10 (reação IV); e reciclagem do alfa-tocoferol pela forma semi-reduzida da coenzima Q10 (reação V)	55
Figura 12	Representação química do alfa-tocoferol	58
Figura 13	Aferição da pressão arterial por pletismografia	62
Figura 14	Teste do Labirinto	63
Figura 15	Teste do Labirinto Aquático de Morris	63
Figura 16	Teste de Memória Curta e Memória Longa	65

Figura 17	Teste Sensório-Motor de Alcance	65
Figura 18	Teste Motor de Reflexo Plantar	66
Figura 19	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto (n=24)	74
Figura 20	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto Aquático de Morris (n=24)	75
Figura 21	Representa o índice de discriminação do Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta (n=24)	78
Figura 22	Representa o índice de discriminação do Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa (n=24)	81
Figura 23	Corte transversal do hipocampo dos grupos estudados com indicação das alterações histopatológicas	83
Figura 24	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação à contagem do número total de células do hipocampo (n=24)	84
Figura 25	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos na contagem de células das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo (n=24)	85
Figura 26	Comparação de média \pm DP entre grupos nos níveis da pressão arterial sistólica (n=24)	86
Figura 27	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de malondialdeído (n=24)	87
Figura 28	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação à contagem de plaquetas (n=24)	89
Figura 29	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de fibrinogênio (n=24)	90
Figura 30	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de LDH (n=24)	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Representa a distribuição de frequência dos escores na comparação entre grupos no Teste Sensório-Motor de Alcance, Teste Motor de Reflexo Plantar, Teste Motor de Reposicionamento Postural e Teste Motor de Queda-Livre (n=24)	73
Tabela 2	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta (n=24)	77
Tabela 3	Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa (n=24)	80
Tabela 4	Representa a média \pm DP do perfil lipídico de ratos SHRSP tratados e controle (n=24), após 4 semanas de tratamento	88
Tabela 5	Representa a média \pm DP do peso corporal, diurese e ingestão de água e ração de ratos SHRSP tratados e controles (n=24)	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ABCA1	Transportador transmembrânico ligante de ATP cassete-A1
AIF	Fator indutor de apoptose
AIT	Ataque isquêmico transitório
alfa-TPP	Proteína transferidora de alfa-tocoferol
AMPA	Ácido L-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico
Apaf-1	Fator-1 da proteína ativadora de apoptose
ASICs	Ativação dos canais de íons ácido-sensíveis
AVE	Acidente vascular encefálico
BAD	Bcl-2 associada com a morte
BAX	Bcl-2 associada a proteína X
BID	Domínio de Bcl-2 interativo
BNDF	Fator trófico derivado do cérebro
CEHC	2'-carboxietil-6-hidroxicromanol
CETP	Proteína de transferência de éster colesteril
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
CREB	Elemento ligante responsivo de AMPc
Cyctc	Citocromo C (Apaf-1)
DISC	Complexo de sinalização de morte induzida
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ESPSP	Potenciais excitatórios pós-sinápticos
FADD	Fas associada à morte
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ID	Índice de Discriminação
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	Lecitina-colesterol acil transferase
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N-Nitro L-Arginina metil-éster hidrocloreídrico
LPL	Lipase lipoproteica

LTP	Potenciação de longa duração
MDA	Malondialdeído
MTP	Poros de transição mitocondrial
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PKC	Proteína Quinase C
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sGC	Enzima guanilato ciclase solúvel
SHRSP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico
SR-BI	Receptor classe B membro 1
TAP	Transportadores associados ao processamento de antígenos
tBID	Forma truncada de BID
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	23
3.2	FATORES DE RISCO	27
3.3	PROCESSO DE FORMAÇÃO DE MEMÓRIA	30
3.4	ALTERAÇÃO DE MEMÓRIA NO AVE	35
3.5	LINHAGEM SHRSP	36
3.6	ESTRESSE OXIDATIVO	39
3.7	ÓXIDO NÍTRICO	42
3.8	N-NITRO L-ARGININA METIL-ÉSTER (L-NAME)	46
3.9	VITAMINA E	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	MODELO ANIMAL	59
4.2	CONDIÇÕES AMBIENTAIS	59
4.3	PERÍODO BASAL E ACLIMATAÇÃO	59
4.4	GRUPOS	60
4.5	SUPLEMENTAÇÃO	60
4.6	L-NAME	60
4.7	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS	61
4.7.1	Análise dos parâmetros biológicos gerais	61
4.7.2	Pressão Arterial Sistólica	61
4.7.3	Testes Neurológicos	62
4.7.3.1	<i>Teste Cognitivo do Labirinto</i>	62
4.7.3.2	<i>Labirinto Aquático de Morris</i>	63
4.7.3.3	<i>Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta</i>	64
4.7.3.4	<i>Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa</i>	64

4.7.3.5	<i>Teste Sensório-Motor de Alcance</i>	65
4.7.3.6	<i>Teste Motor de Reflexo Plantar</i>	66
4.7.3.7	<i>Teste Motor de Reposicionamento Postural</i>	66
4.7.3.8	<i>Teste Motor de Reflexo de Queda-livre</i>	66
4.7.4	Exames Bioquímicos	67
4.7.4.1	<i>Marcador de estresse oxidativo</i>	67
4.7.4.2	<i>Lactato Desidrogenase Total (LDH)</i>	67
4.7.4.3	<i>Fibrinogênio</i>	67
4.7.4.4	<i>Contagem de plaquetas</i>	68
4.7.4.5	<i>Perfil lipídico</i>	68
4.8	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL	69
4.8.1	Análise Histopatológica	70
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS	72
5.1	TESTES NEUROLÓGICOS	72
5.1.1	Testes Sensório-Motores	72
5.1.2	Testes Neurológicos Cognitivos - Memória Espacial	74
5.1.3	Testes Neurológicos Cognitivos - Memória de Reconhecimento	75
5.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	81
5.2.1	Análise Histopatológica - Lesão Tecidual	81
5.2.2	Contagem de Células Hipocampais	84
5.3	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	85
5.4	ESTRESSE OXIDATIVO	86
5.5	PERFIL LIPÍDICO	87
5.6	PARÂMETROS COAGULATÓRIOS	88
5.7	MARCADOR DE INFLAMAÇÃO	90
5.8	PARÂMETROS BIOLÓGICOS	91
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	105

ANEXO A - Tabelas com valores dos testes neurológicos do Labirinto, Labirinto Aquático de Morris e Contagem de Células do sub-região

126

1 INTRODUÇÃO

As doenças cerebrovasculares são a segunda maior causa de morte e demência, e a causa principal de incapacidade no mundo. Na classificação por gênero, são a terceira causa de mortes em homens, depois da isquemia cardíaca e do câncer de pulmão. Nas mulheres são as causas primárias de morte (SOLER; RUIZ, 2010).

Segundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência global destas doenças é estimada em 200 casos por 100.000 habitantes. Em uma revisão, com bases de dados a partir da década de 90 a incidência variou de 130 a 410 casos por 100.000 pessoas-ano (FEIGIN et al., 2003).

No Brasil, estas doenças ocupam a primeira posição na carga de enfermidades, contribuindo de forma expressiva para a mortalidade e morbidade precoce. Dados do Ministério da Saúde, em 2007, indicam que dentre as doenças vasculares, as cerebrovasculares ocuparam o primeiro lugar na mortalidade com coeficiente de 52,61 óbitos por 100 mil habitantes, sendo o acidente vascular encefálico (AVE), a principal forma deste grupo de doenças (FURUKAWA; MATHIAS; MARCON, 2011).

As comorbidades promovidas pelo desenvolvimento do AVE, dependendo do grau de comprometimento das funções cerebrais, também contribuem para o agravamento do quadro estabelecido pela doença. Segundo Nair e Lincoln (2007), os problemas de memória pós-isquemia cerebral são relatados constantemente por pacientes acometidos pelo AVE. Estudos indicaram que as funções mais comumente envolvidas, em lesões cerebrovasculares, parecem ser aquelas associadas com a memória e função executiva. Outras pesquisas ainda têm examinado a relação entre a hipertensão, dano vascular, e comprometimento cognitivo (VICARIO et al., 2011).

Com vistas a minimizar a incidência do AVE e suas comorbidades, o conhecimento e o controle dos fatores de risco são importantes vias das políticas de saúde pública para a prevenção da doença. Em relação a estes fatores destaca-se a pressão arterial sanguínea, como o mais importante fator de risco modificável para qualquer tipo de acidente vascular encefálico (hemorrágico e isquêmico) e também para o ataque isquêmico transitório (AIT). A elevação da pressão arterial acelera o

processo de aterosclerose, sendo este processo um dos maiores preditores do AVE isquêmico. Em estudos clínicos prospectivos de larga escala, foi observado que a elevação relativa da pressão arterial promove o aumento do risco do desenvolvimento do AVE. Por outro lado, a redução da pressão arterial, mesmo de forma modesta, reduz o risco de desenvolver um processo isquêmico ou hemorrágico cerebral (SOLER; RUIZ, 2010).

Além da hipertensão arterial, as dislipidemias (MOREIRA et al., 2005), idade, fumo, diabetes (HAMER et al., 2011), têm sido apontados como os maiores fatores de risco relacionados ao AVE. Em relação aos aspectos coagulatórios, Cushman e colaboradores (1996) citam o fibrinogênio, fator VII, e fator VIII de coagulação como associados a doenças vasculares, incluindo o AVE.

Atualmente, também existem fortes evidências da implicação do estresse oxidativo na etiopatogenia das disfunções vasculares em geral (PAWLAK; PAWLAW; MYSLIWIEEC, 2005). O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio simplesmente inibe as defesas antioxidantes endógenas, apontando para um subsequente dano oxidativo e morte celular (PONG, 2003). Este dano no tecido vascular pode levar a processos inflamatórios envolvidos na disfunção endotelial e disparo dos mecanismos vasoconstritores.

Em adição, Nanetti, Taffi e Vignini (2007), descreveram que a atividade antioxidante do plasma poderia ser um importante fator de proteção cerebral. Interessantemente, algumas evidências têm indicado os efeitos benéficos dos nutrientes antioxidantes em isquemias cerebrais (IKEDA; NEGISHI; YAMORI, 2003).

Vários estudos têm reportado importantes benefícios na redução do risco de AVE e na recuperação pós-AVE em pacientes que consumiram alimentos ricos em micronutrientes, incluindo vitaminas do complexo B e as vitaminas antioxidantes E e C (SANCHEZ-MORENO; JIMÉNEZ-ESCRIG; MARTÍN, 2009).

Neste aspecto, o vitâmero da vitamina E, denominado alfa-tocoferol, se destaca por apresentar efeitos benéficos relacionados às propriedades antioxidantes (PONG, 2003; MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004).

Em um estudo, *in vitro*, conduzido com células neuronais submetidas à hipóxia seguida de reperfusão, as células incubadas com alfa-tocoferol permaneceram intactas enquanto as células controles apresentaram processos necróticos e apoptóticos (TAGAMI et al., 1998).

Outros autores apontaram que os efeitos protetores conferidos ao alfa-tocoferol podem estar associados com a capacidade desta vitamina em aumentar a disponibilidade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (FREEDMAN et al., 2000).

Diversos fatores de risco do AVE têm envolvimento direto com o metabolismo do óxido nítrico (NO). O NO produzido nas células endoteliais promove o relaxamento vascular diminuindo a pressão arterial. Da mesma forma, o óxido nítrico previne a ativação e agregação plaquetária, e ainda reduz a adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular. Além disso, tem sido relatada a eficiência do NO com relação ao efeito antiproliferativo preservando o diâmetro da luz vascular (DUSSEL; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Outras pesquisas ainda incluem o óxido nítrico na categoria de neurotransmissores essenciais envolvidos no processo de formação de memória (OTA et al., 2010).

Entretanto, o óxido nítrico também pode produzir um efeito oxidativo ao reagir com o íon superóxido na formação do peroxinitrito, uma molécula altamente reativa e lesiva para as membranas celulares. Por outro lado, a inibição das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), as isoformas constitutivas, apontam para déficits nas respostas neurológicas, tais como distúrbios de memória e comprometimento motor. Outros autores ainda relatam alterações pressóricas e coagulatórias (MISHIMA et al., 2003; MOORE; SANZ-ROSA; EMERSON, 2011).

Ainda em relação à vitamina E, um estudo conduzido com ratas prenhas, demonstrou que a administração de elevadas doses de vitamina E apresentaram déficits neurológicos na prole, e os autores concluíram que a Vitamina E pode influenciar na sinalização e plasticidade sináptica do hipocampo do feto (BETTI et al., 2011). Outro estudo demonstrou que ratos espontaneamente hipertensos propensos ao AVE (SHRSP), suplementados com altas doses de alfa-tocoferol, tiveram aumentada a pressão arterial com diminuição da expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase e níveis inalterados de marcadores de peroxidação lipídica (MIYAMOTO et al., 2009). Por outro lado, recentes estudos de nosso laboratório revelaram que a administração de alfa-tocoferol reduziu a pressão arterial e modulou o perfil lipídico de ratos SHRSP (GUIMARÃES et al., 2009). Em

humanos, autores indicaram que as suplementações de vitaminas C e E não reduziram o risco de eventos isquêmico vasculares (SESSO et al., 2008).

Assim, estes resultados controversos estimulam a realização de pesquisas com os objetivos de esclarecer a influência do alfa-tocoferol na preservação da resposta neurológica, e no controle dos fatores de risco do AVE e determinar se esta vitamina possui efeitos protetores durante a inibição crônica da óxido nítrico sintase constitutiva.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a suplementação de alfa-tocoferol é capaz de propiciar a melhora das respostas neurológicas e modular os fatores de risco do AVE em ratos da linhagem SHRSP submetidos à injúria pela inibição das isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase (cNOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da suplementação de alfa-tocoferol sobre a resposta motora de ratos espontaneamente hipertensos propensos ao AVE (SHRSP);

Investigar o efeito da suplementação de alfa-tocoferol sobre a memória curta e a consolidação da memória (memória longa);

Investigar se a inibição da óxido nítrico sintase constitutiva afeta o processo de formação de memória e promove déficits motores em ratos SHRSP;

Investigar a inibição da óxido nítrico sintase constitutiva sobre o perfil lipídico de ratos SHRSP;

Investigar os efeitos da suplementação de alfa-tocoferol em ratos SHRSP sobre o fibrinogênio e plaquetas;

Avaliar se o alfa-tocoferol é capaz de reverter ou atenuar os efeitos deletérios da inibição da cNOS nos parâmetros pressóricos e coagulatórios;

Avaliar se o alfa-tocoferol é capaz de reverter ou atenuar os efeitos deletérios da inibição da cNOS nos parâmetros oxidativos e inflamatórios;

Avaliar se o alfa-tocoferol preserva a função de memória em animais submetidos à inibição da cNOS;

Investigar a resposta motora de animais submetidos à inibição da cNOS tratados com alfa-tocoferol;

Investigar as possíveis alterações histopatológicas nos cérebros dos ratos da linhagem SHRSP, controles, tratados e submetidos à injúria pela inibição da cNOS.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

A OMS define o acidente vascular encefálico, como uma doença causada pelo rompimento do suprimento de sangue no cérebro, sendo causada pelo bloqueio do fluxo sanguíneo (AVE isquêmico) ou pela ruptura de um vaso sanguíneo, denominado AVE hemorrágico (OMS, 2004).

Aproximadamente 85% dos acidentes vasculares encefálicos são causados pelo início súbito de inadequação de fluxo sanguíneo em alguma parte ou em todo o cérebro. Os acidentes vasculares encefálicos restantes são divididos em hemorragia no tecido cerebral (hemorragia parenquimatosa) e hemorragia nos espaços que circundam o cérebro, mais frequentemente o espaço subaracnóideo (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

As hemorragias intracerebrais são geralmente classificadas de acordo com a localização, e se apresentam a forma primária ou secundária. O local da hemorragia é dividido em lobos, profundidade, tronco encefálico ou cerebelar. Cerca da metade das hemorragias é localizada profundamente nos gânglios da base, cerca de um terço é lombar, enquanto o restante está localizado na fossa craniana posterior (MAYER; RINCON, 2005). O local do hematoma pode fornecer uma indicação se representa uma hemorragia primária ou secundária. As causas secundárias são aneurisma, malformação arteriovenosa, malformação cavernosa, tumor cerebral, coagulopatias, trombose venosa sinusal e angiopatia amilóide, bem como outras doenças (RENNING et al., 2008).

Com relação ao AVE isquêmico, a gravidade do insulto, definida pelo grau e pela duração do fluxo sanguíneo reduzido, hipóxia ou hipoglicemia. Este quadro determina se o cérebro apresenta apenas uma disfunção temporária, como um ataque isquêmico transitório; lesão irreversível de apenas alguns poucos neurônios mais vulneráveis (necrose seletiva); ou infarto cerebral, no qual o dano ocorre em áreas extensas envolvendo todos os tipos de células (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

Segundo Won, Kim e Gwag (2002), a função cerebral é prejudicada imediatamente após a queda do fluxo sanguíneo a um quarto dos valores normais.

Caso a condição isquêmica persista por um período prolongado de tempo, a morte neuronal ocorre rapidamente nas áreas centrais afetadas, e é acompanhada pela morte celular secundária da região da penumbra isquêmica, a qual evolui lentamente devido a ativação de cascatas celulares que levam a apoptose, após o processo de reperfusão.

De acordo com Evora e colaboradores (1996), a lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. A reversão da desta isquemia e a restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em um número de efeitos deletérios: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido.

Outros autores indicaram que a isquemia cerebral, desencadeia uma complexa cascata de eventos metabólicos que envolvem a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Estes radicais podem mediar uma série de danos que ocorrem após os ataques isquêmicos transitórios e na região de penumbra infartada causada por isquemias permanentes (LOVE, 1999).

A cascata de eventos citada, tem como base a liberação maciça de glutamato e uma super-ativação de receptores glutaminérgicos. Concomitantemente, há uma elevação sustentada de cálcio intracelular que desencadeiam processos cálcio-dependentes, tais como ativação de fosfolipases, proteases e endonucleases, levando à morte celular, por necrose, em um processo denominado “excitotoxicidade” (SUNIL et al., 2011). Este mecanismo de excitabilidade tóxica também é descrita nos mecanismos de apoptose (WANG; QIN, 2010). Além disso, níveis elevados de cálcio promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico e o peroxinitrito (SUNIL et al., 2011).

Na região de penumbra isquêmica, o processo de morte celular continua lentamente através de dois processos gerais de apoptose: a apoptose intrínseca e a extrínseca (Figura 1). Na apoptose intrínseca (Figura 2), após a isquemia, há uma elevação do cálcio citosólico através do estímulo promovido pelo glutamato de N-metil-D-aspartato (NMDA) ou pelos receptores do ácido L-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico (AMPA) ou ainda pela ativação dos canais de íons ácido-

sensíveis (ASICs). O aumento intracelular de cálcio ativa as calpaínas e medeia a clivagem do *domínio de Bcl-2 interativo* (BID), para a forma *truncada de BID* (tBID). No tBID a membrana mitocondrial interage com proteínas apoptóticas, como a proteína Bcl-2 associada com a morte (BAD), e a *Bcl-2 associada a proteína X* (BAX). Depois da heterodimerização destas proteínas apoptóticas com tBID, os poros de transição mitocondrial são abertos, liberando o citocromo C (CytC). Uma vez no citosol o CytC liga-se com a fator-1 da proteína ativadora de apoptose (Apaf-1) e procaspase-9 para formar o apoptossoma que ativa a caspase-9 e posteriormente a caspase-3. Esta última enzima, cliva enzimas de reparos do DNA, tais com a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que leva a danos do DNA e conseqüente apoptose. Concomitantemente, o fator indutor de apoptose (AIF) transloca-se rapidamente para o núcleo onde promove, em larga escala, a fragmentação do DNA e morte celular de uma maneira caspase-independente. Em resposta ao dano no DNA, outra via nuclear de apoptose pode ser ativada: a fosforilação da proteína p53 (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009).

No mecanismo extrínseco de apoptose (Figura 3), o ligante Fas extracelular (pertencente a família da TNF-alfa), liga-se aos *receptores de morte* (FasR), que desencadeiam o recrutamento da proteína da proteína *Fas associada a morte* (FADD). FADD liga-se a procaspase-8 para criar o *complexo de sinalização de morte induzida* (DISC), que ativa a caspase 8. Ativando a caspase 8 ou clivando tBID criam-se caminhos diferentes de morte celular que induzirão apoptose gerada pela mitocôndria ou pela ativação direta da caspase-3. No tBID, a membrana mitocondrial interage com Bax, e esta dimerização leva a abertura dos poros de transição mitocondrial (MTP), liberando assim o citocromo C (CytC), que executa a morte celular via caspase 3-dependente (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009).

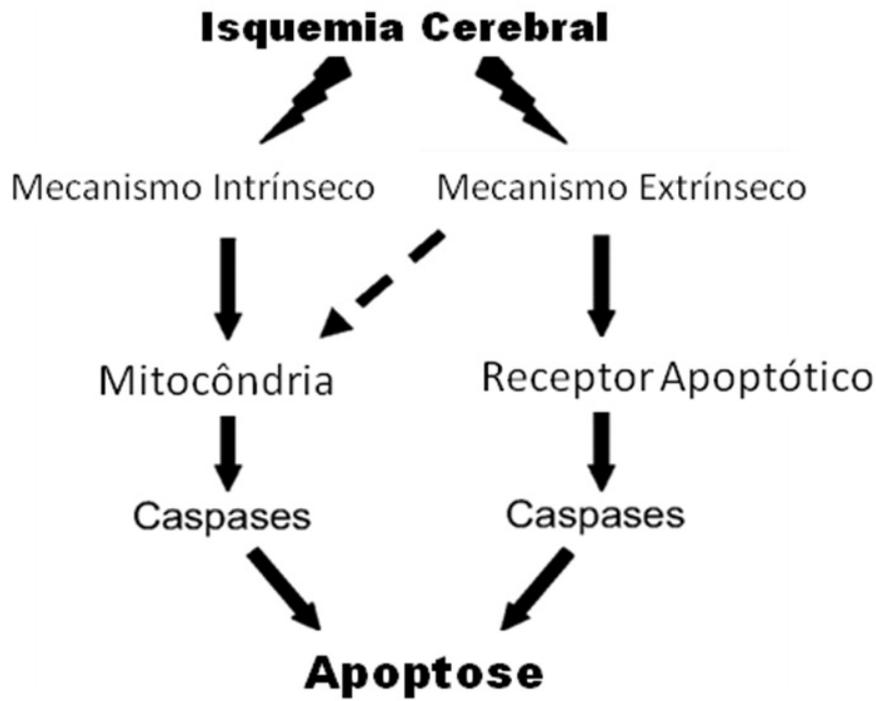


Figura 1: Fluxograma esquemático do mecanismo de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009).

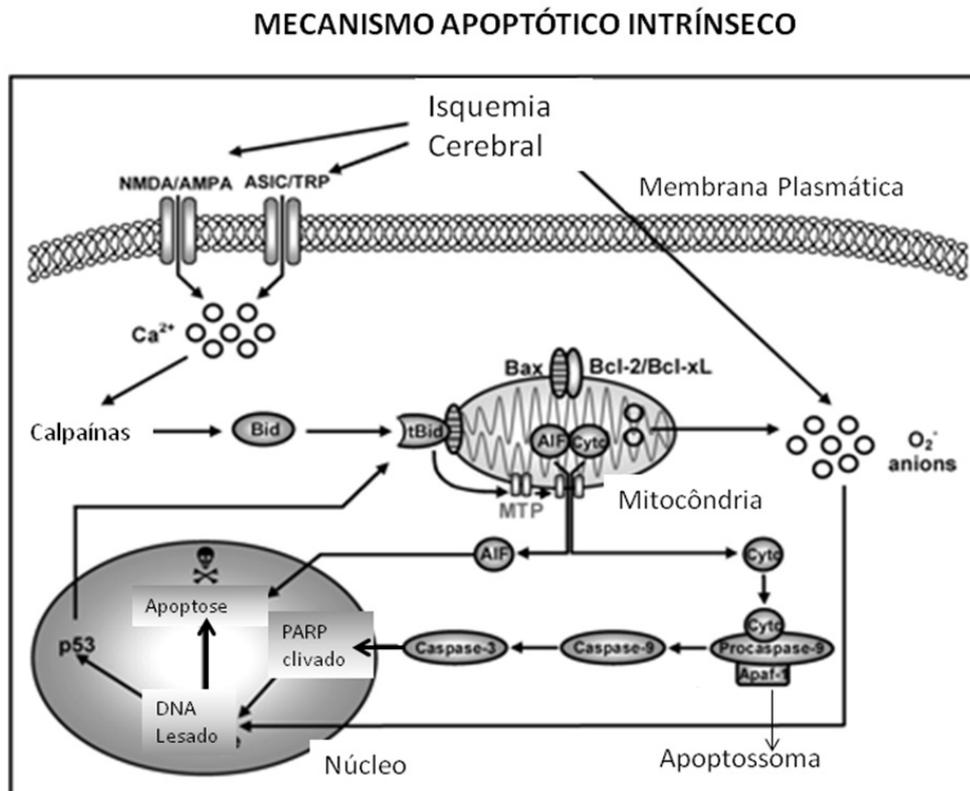


Figura 2: Representação gráfica do mecanismo intrínseco de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009).

MECANISMO APOPTÓTICO EXTRÍNSECO

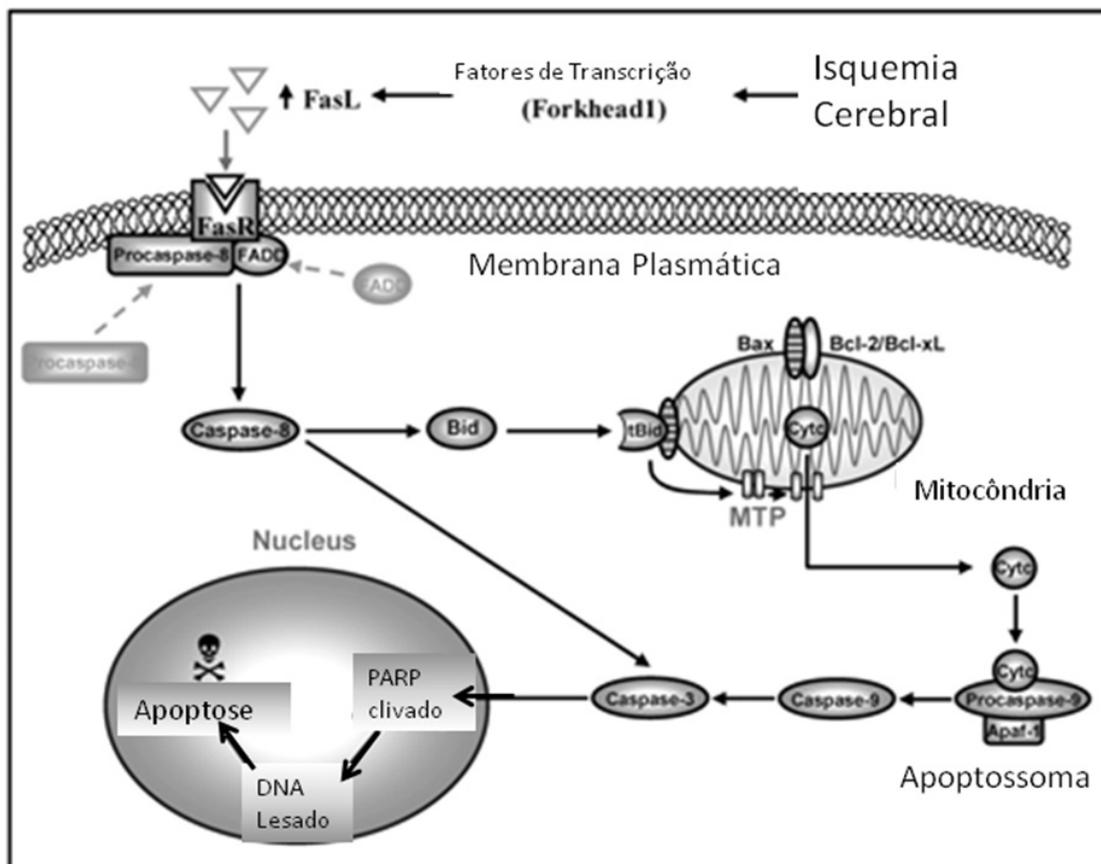


Figura 3: Representação gráfica do mecanismo extrínseco de apoptose no AVE isquêmico (Modificado de Broughton, Reutens e Sobey, 2009).

3.2 FATORES DE RISCO

Dentro do contexto do AVE, é importante o entendimento etiopatológico da doença e a prevenção dos fatores de risco. De acordo com Goldman e Ausiello (2005) a hipertensão é o fator de risco mais importante do AVE podendo aumentar em quatro vezes a ocorrência da enfermidade. Outros achados ainda indicam o diabetes, a obesidade e a dislipidemia como importantes fatores influenciadores do processo do AVE (NOVÁK; ZÉTOLO; MUZZIO, 2003). Outros fatores de risco potenciais incluem a inatividade física, a obesidade, coagulopatias, a intolerância à glicose, dietas e utilização de altas doses de contraceptivos (BRONNER; KANTER; MANSON, 1995).

A hipertensão arterial sistêmica pode ser definida como uma doença crônica, multifatorial, caracterizada por pressão arterial elevada e que afeta tanto a função quanto a estrutura dos vasos sanguíneos, principalmente pequenas artérias e arteríolas. Essa enfermidade é uma das mais importantes causas de morbimortalidade universal, e identificada como um dos mais prevalentes fatores de risco para o desenvolvimento de doença coronariana, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, insuficiência renal e insuficiência cardíaca congestiva (ANDRADE et al., 2002).

A pressão arterial elevada é o principal fator de risco para todos os subtipos de acidente vascular encefálico (HAAPANIEMI; HILLBOM; JUVELA, 1997). Corroborando com esse fato, Leppälä e colaboradores (1999), estudaram os fatores de risco para os diferentes subtipos de acidente vascular encefálico e concluíram que valores de pressão arterial sistólica maior ou igual a 160 mmHg, aumentam o risco de desenvolver todos os subtipos de acidente vascular encefálico.

No que consta sobre as dislipidemias, autores relatam que esta alteração é definida como o aumento ou diminuição das lipoproteínas plasmáticas, envolvidas direta e indiretamente, por vários mecanismos, no processo aterotrombótico. Níveis plasmáticos elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL) são considerados um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A hipótese para esta injúria propõe que o primeiro passo na aterogênese seja a disfunção endotelial induzida por fatores de risco, em especial, pela exposição do endotélio vascular à LDL oxidada (LDL-ox) (XAVIER et al., 2004).

A relação entre colesterol total e HDL colesterol com acidente vascular encefálico, ainda não está clara. Há evidências que a concentração sérica de colesterol total é inversamente associado com o risco de desenvolvimento de acidente vascular hemorrágico (KAGAN et al., 1985; ISO et al., 1989). Contrariando essas evidências, elevados níveis séricos de colesterol total parece elevar o risco para infarto cerebral (KAGAN et al., 1985; ISO et al., 1989; REED, 1989; LINDERSTROM; BOYSEN; NYBOE, 1994).

Interessantemente, como exposto acima, os fatores de risco responsáveis pela ocorrência do AVE são ocasionados com grande frequência pelo estresse oxidativo. Corroborando com esta afirmativa, Vaziri (2004), relatou que estresse oxidativo, hipertensão e inflamação estão intimamente relacionados com o

progressivo dano de um órgão-alvo. Apesar das reações adversas decorrentes dos processos inflamatórios, as substâncias produzidas neste sistema podem ser um importante indicador de lesão tecidual. Em 1983, Donnan e colaboradores, já haviam associado o aumento dos níveis de LDH (lactato desidrogenase), um marcador inflamatório com acidentes vasculares encefálicos. Estudos recentes *in vitro* indicaram aumento do LDH em culturas de células neuronais submetidas injúria por administração de ácido glutâmico (NAVON et al., 2011).

Em outro estudo, Singh e Mehta (2003), apontaram que o aumento do estresse oxidativo é conhecido como um importante aspecto da aterosclerose hipercolesterolêmica, cujo processo está interligado com o AVE.

Nos parâmetros coagulatórios, Undas e colaboradores (2011) associaram a circulação ativa do fator tecidual (TF) e fator de coagulação ativo XI como frequentemente relacionados a processos isquêmicos cerebrovasculares. Estudos também correlacionaram a contagem de plaquetas com valores elevados em pacientes acometidos com AVE isquêmico (NTAIOS et al., 2011).

Wang e colaboradores (2009), ainda afirmaram que o estresse oxidativo pode suprimir a capacidade anticoagulantes do endotélio e aumentar a atividade pró-inflamatória, aumentando o risco de tromboembolismo venoso. A aumentada atividade de pró-oxidantes promove a montagem do complexo protrombinase e, posteriormente a geração de trombina. Adicionalmente, pacientes acometidos de AVE isquêmico apresentaram os níveis de fibrinogênio aumentados (ALVAREZ-PEREZ; CASTELO-BRANCO; ALVAREZ-SABIN, 2011). Smout e colaboradores (2009) descreveram aumento dos níveis de fibrinogênio de pacientes acometidos de AVE isquêmico. Outros trabalhos revelaram a associação de parâmetros reológicos do sangue e função cognitiva, com ênfase no papel do fibrinogênio. Os níveis aumentados de fibrinogênio podem ser um fator de propensão ao acidente vascular encefálico isquêmico trombótico, e a manutenção destes níveis, pode significar um fator neuroprotetor (VELCHEVA; NIKOLOVA, 2008).

3.3 PROCESSO DE FORMAÇÃO DE MEMÓRIA

A formação da memória é um processo extremamente complexo que envolve áreas específicas do encéfalo, conexões neurais, mecanismos moleculares e a síntese de proteínas.

De acordo com Purves e colaboradores (2004), aprendizagem é o nome dado ao processo pelo qual novas informações são adquiridas pelo sistema nervoso e é observável por meio das mudanças no comportamento. Por sua vez, memória refere-se à codificação, armazenamento e a recuperação de informações aprendidas.

O processamento inicial da informação é a codificação que potencialmente produz traços de memória (ou engramas), e combina informações que exigem uma comparação contínua do ambiente atual com a representação interna do ambiente. Em seguida, ocorre o armazenamento que se refere a criação de um registro permanente de informação após a sua codificação inicial. Após as duas primeiras etapas de codificação e armazenamento, a terceira fase é chamada de recuperação ou recolhimento que é relativo à operação de acesso a informação armazenada (KOEHL; ABROUS, 2011).

O armazenamento da memória também pode ser dividida em memória de curto e longo prazo. Memória de curto prazo tem uma capacidade limitada e dura apenas por um período de vários segundos a minutos. Em contraste, a memória de longo prazo pode armazenar grandes quantidade de informação por longos períodos de tempo. Esta memória pode ser subdividida em memória declarativa (explícita) e não-declarativa (implícita) (KOEHL; ABROUS, 2011).

A memória declarativa é o armazenamento (e recuperação) de material que está disponível para a consciência e pode ser expressa pela linguagem. Exemplos de memória declarativa podem ser descritas como a capacidade de lembrança de números, músicas, ou imagens de alguns eventos passados. Memória não-declarativa (ou memória processual) são memórias não-disponíveis para a consciência, e em geral, adquiridas e recuperadas em nível inconsciente como a capacidade de fazer associações inúmeras, como discar um telefone, dentre outras. Nos humanos e em outros mamíferos, a memória declarativa, normalmente se refere ao armazenamento de informações pontuais (ex: a ração fica dentro do pote) e que

dependem da integridade do lobo medial temporal. A memória não-declarativa pode ser referida como aquela associada ao aprendizado e armazenamento de associações sensoriais e habilidades motoras que não são dependentes da porção temporal medial do cérebro (PURVES et al., 2004).

As principais estruturas cerebrais, envolvida com as memórias declarativas são o hipocampo juntamente com outras estruturas do lobo medial temporal. Em relação às memórias não-declarativas as informações são mediadas pelo neostriato e pelo cerebelo (KOEHL; ABROUS, 2011).

Dentro deste processo a neurogênese de células destas estruturas parece desempenhar um papel fundamental no processo de formação da memória. No cérebro adulto, duas regiões receberam destaque em relação a neurogênese: o hipocampo e a zona subventricular das paredes laterais do ventrículo. Outros autores reportaram neurogênese no giro denteado do hipocampo de cérebros de mamíferos adultos, incluindo os humanos. A neurogênese no hipocampo é parte do sistema límbico-cognitivo, envolvida em uma rede integrada com os processos de aprendizado, memória, atenção, motivação e estados emocionais. O giro dentado recebe múltiplos estímulos sensoriais que são transmitidos pelas aferências corticais e subcorticais. A entrada principal para o giro dentado é a chamada via perfurante, que se origina da camada do córtex entorrinal, e está dividida em via perfurante medial, que processa a informação espacial, e o componente lateral, que processa as informações não-espaciais da informação (KOEHL; ABROUS, 2011).

Estudos sugerem que o neurônio recém-produzido desempenha papel importante nas funções associadas à áreas neurogênicas. De fato, um aumentado corpo de evidências baseado na relação estrutura-função do cérebro suporta o envolvimento da neurogênese no processamento de memória em adultos. Neurônios olfativos recém-formados são envolvidos na memória olfativa, por outro lado, neurônios recém-formados no hipocampo têm sido relacionados a complexas formas de memória espacial ou associativa (LEUNER et al., 2006). Em relação aos mecanismos de processamento e armazenamento da memória, estudos apontam para as sinapses de potenciação de longa duração (LTP), como um modelo celular de aprendizagem e memória (MALINOW, 1991). De acordo com Bliss e Collingridge (1993), a LTP no hipocampo é o principal modelo experimental para avaliar a base sináptica da aprendizagem e memória em vertebrados.

Em relação as estruturas, as camadas piramidais do hipocampo apresentam-se subdividas em CA1, CA2 e CA3. O termo “CA” vem do latim *cornus ammon*, que significa chifre de carneiro que se assemelha a forma do hipocampo. Os dendritos das células piramidais da região CA1 formam uma espessa banda (o estrato radiatum), onde recebem sinapses dos feixes colaterais de Schaffer, que são os axônios das células piramidais da região CA3. A estimulação elétrica dos axônios colaterais de Schaffer gera *potenciais excitatórios pós-sinápticos* (ESPSP) nas células CA1. Se a estimulação dos axônios de Schaffer acontece apenas duas ou três vezes por minutos, o tamanho do potencial evocado ESPSP da células CA1 permanece constante. No entanto, um breve estímulo de alta frequência para os mesmos axônios causa a LTP, que é evidente como um aumento prolongado na amplitude dos ESPSP. A LTP não ocorre apenas no hipocampo, mas em outras sinapses excitatórias em uma variedade de regiões do cérebro, incluindo córtex, amígdala e cerebelo (PURVES et al., 2004).

Autores têm descrito que a LTP têm ligação direta e estreita com a plasticidade cerebral. Pesquisas experimentais têm demonstrado que o início e manutenção da plasticidade sináptica, especialmente em neurônios piramidais CA1 do hipocampo, têm relação direta com certos tipos de aprendizagem. Em adição, a LTP induzida artificialmente pode produzir aumentos ou alterações morfológicas em ramos dendríticos que deram origem ao estímulo. Este achado indica que a LTP pode gerar novas ou aumentar sinapses existentes, fato que pode constituir a principal base estrutural da memória (MORGADO-BERNAL, 2011).

Outros estudos apontaram que em milésimos de segundos, a ativação de sinapses relevantes gera uma liberação pré-sináptica de glutamato, o que ativa os receptores de glutamato ionotrópicos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) produzindo um fluxo de sódio, que despolariza o neurônio pós-sináptico. Nos segundos seguintes que seguem a despolarização pós-sináptica, os receptores NMDA (NMDAr) têm removidos os íons Mg^{+2} que estão bloqueando estes receptores, dando assim, origem a um grande influxo de Ca^{+2} no neurônio pós-sináptico através dos próprios canais NMDAr e outros canais voltagem-dependentes de glutamato localizados no mesmo neurônio. Contudo, diversas proteínas-quinases (cálcio-calmodulina dependente, cálcio fosfolípido-quinase dependente - PKC, AMPc-quinase dependente e outros), podem ser ativados em

diferentes tempos para promover o influxo massivo de cálcio e outros sinais intracelulares originados na membrana pós-sináptica, servindo de regulador positivo para os estágios precoce e tardio da plasticidade sináptica (LTP) e consolidação da memória (MORGADO-BERNAL, 2011).

Em relação às memórias de curto prazo, estas são caracterizadas pela retenção de curta duração de informações conscientes apoiada por modificação translacional transitória ou não-estabilizada de moléculas pré-existentes que alteram a eficácia da transmissão sináptica na rede plástica neural. Neste caso, quando há a necessidade de recuperar a informação e/ou repetir a experiência, poderá haver a ocorrência do mecanismo supracitado, resultando em síntese de novas proteínas e mudanças estruturais neuronais relevantes. Neste ínterim, o processo de consolidação da memória tem sido ligado ao diálogo entre sinapses e genes. Como resultado deste diálogo, novos ramos dendríticos são formados e mantidos, provendo uma persistente mudança estrutural sobre a qual memória de longa duração (dias, semanas e até mesmo a vida inteira), pode ser estabelecida (KANDEL, 2001).

A relação entre sinapses e genes gera a produção de proteínas necessárias para consolidação da memória. Neste tema, autores têm dividido a memória em pelo menos dois estágios: uma fase independente de síntese de proteínas (memória de curta duração), que pode durar de minutos a horas e uma fase dependente de síntese de proteínas (memória de longa duração), que podem durar horas, dias ou mais tempo. Contudo, uma simples cascata molecular consistindo da ativação de receptores, mudanças na fosforilação de proteínas e alteração transitória na produção de proteínas podem ser insuficiente para a persistência da consolidação (memória de longa duração). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado a existência da fase de síntese de proteína prolongada, para a persistência da memória comportamental, várias horas após a aquisição da memória (MARTÍNEZ-MORENO; RODRÍGUEZ-DURÁNA; ESCOBAR, 2011).

Evidências recentes têm apontado o *fator* trófico derivado do cérebro (BDNF), cuja transcrição é regulada pelo *elemento ligante responsivo de AMPc* (CREB), como um produto essencial da síntese protéica para a expressão e persistência da plasticidade sináptica de longa duração em cérebros adultos. BDNF é requerido para a formação de ambos: memória de curta duração e memória de

longa duração, e é continuamente ativada de maneira tempo-dependente após a consolidação por persistência da memória hipocampal de longa duração (MARTÍNEZ-MORENO; RODRÍGUEZ-DURÁNA; ESCOBAR, 2011).

O óxido nítrico (NO) também desempenha um papel importante na modulação neuronal, influenciando no desenvolvimento neuronal, excitabilidade e neurotransmissão. Várias fontes celulares, incluindo, neurônios, glia e microvasculaturas podem participar da disponibilidade basal do NO e da sinalização transcelular do NO. Segundo Ota e colaboradores (2010) uma importante função do NO é a modulação da força sináptica que é necessária para consolidar certas formas de aprendizagem e memória. No LTP, receptores pós-sinápticos NMDAr e AMPAr são ativados e elevam o cálcio intracelular. Este cálcio gera NO em processo cálcio-calmodulina dependente e subseqüentemente, NO reforça a liberação pré-sináptica de glutamato através do transporte retrógrado, via fosforilação proteínas sinápticas dependente de GMPc.

Na via pós-sináptica NO age por estimulação da ciclase guanilato solúvel apontando para a formação de GMPc. O GMPc age no alvo das quinases GMPc-dependentes, aumentando a expressão de AMPA na superfície celular. A aumentada atividade deste receptor excitatório resulta na fosforilação de quinases (cálcio-calmodulina e PKC) sendo fundamental para a indução da LTP

No cerebelo o NO também participa da depressão de longa duração (LTD), importante para formas específicas de aprendizado motor. Neste modelo de LTD, as sinapses nas células de Purkinje implicam na difusão de NO dentro das regiões pós-sinápticas nos neurônios de Purkinje, onde é induzida a ativação de proteína quinase G (PKG). Esta proteína produz hiperfosforilação de receptores AMPA indicando uma internalização do receptor e baixa resposta excitatória ao glutamato (CURRÁS-COLLAZO, 2011).

No hipocampo o modelo de LTP e de LTD são descritos como complementares e fundamentais para o processo de aprendizagem e memória. Estudos demonstraram que na LTP há o envolvimento de mecanismos que aumentam a fosforilação de proteínas, enquanto que na LTD ocorre a desfosforilação de proteínas (BEAR; MALENKA, 1994). A atividade das proteínas quinases e fosfatases estão alteradas durante a LTP e a LTD e autores ainda descreveram que as quinases e as fosfatases regulam os receptores de glutamato

após a estimulação respectiva de LTP e LTD (THIELS et al., 2002). Em adição, Frey, Huang e Kandel (1993) descreveram que inibidores de quinases bloquearam LTP e facilitaram a LTD. Similarmente a LTP hipocampal, a LTD hipocampal foi descrita como persistente durando dias na área CA1, em estudos conduzidos *in vivo*. (THIELS et al., 2002).

Interessantemente, correntes tradicionais descrevem a LTP como o principal mediador do armazenamento da memória espacial no hipocampo, enquanto que a LTD seria um auxiliar desempenhando funções de esquecimento. Contudo, novas vertentes têm indicado que a LTD contribui diretamente para o armazenamento hipocampal de informações. De fato, a LTD poderia dominar o processamento da característica espacial armazenada e desta forma, LTP e LTD associadas poderiam facilitar a geração de um mapa espacial cognitivo, sendo fundamentais para a formação da memória espacial (MANAHAN-VAUGHAN; BRAUNEWELL, 1999; KEMP; MANAHAN-VAUGHAN, 2007).

3.4 ALTERAÇÃO DE MEMÓRIA NO AVE

As alterações provocadas por lesões neuronais durante uma isquemia cerebral podem levar a dificuldades cognitivas, prejuízo da memória, progredindo para distúrbios comportamentais (SUNIL et al., 2011).

Faraij, Metz e Sutherland (2011), relataram que no processo de isquemia focal, há uma exacerbação da perda da função cognitiva. Aradillas, Libon e Schwartzman (2011), também reportaram que o ataque isquêmico ao afetar a região do hipocampo direito prejudica a cognição com relação as habilidades de navegação espacial. Brijesh e Ravindran (2007), demonstraram que danos no hipocampo apontam para a perda da habilidade de conversão da memória curta para novas memórias de longa duração. Tal situação podem ocorrer devido a epilepsia, AVE, demência e traumas cranianos.

Os neurônios no hipocampo são particularmente sensíveis a eventos isquêmicos, sugerindo que os insultos vasculares subclínicos poderiam afetar especificamente esta área, levando a déficits cognitivos. Evidências revelam que na isquemia global, ocorrida após uma parada cardíaca e AVE lacunar, resultam em

significante dano no hipocampo. Em adição, lesões no hipocampo induzidas pelo AVE são intimamente ligadas a déficits cognitivos associados com prejuízo na memória (McDONALD; CRAIG; HONG, 2008).

Estudos em modelos animais indicaram que a oclusão da artéria cerebral média pode provocar um déficit na memória de longa-duração, no entanto, sem gerar déficit sensório-motor concomitante (HATTORI et al., 2000).

Outros estudos têm demonstrado que as vias de morte apoptótica neuronais são ativadas no hipocampo (McDONALD; CRAIG; HONG, 2008). Gaur e Kumar (2011), também demonstraram que a oclusão da carótida comum em ratos apresentam na região do hipocampo significativa alteração nos níveis de defesa antioxidante relacionada a glutathione, aumento da atividade da acetilcolinesterase e de marcadores pró-inflamatórios (TNF-alfa).

3.5 LINHAGEM SHRSP

Os ratos SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat), são animais espontaneamente hipertensos com propensão ao acidente vascular encefálico e são normalmente utilizados como modelos animais para estudo de disfunção endotelial, hipertensão e acidente vascular encefálico (McBRIDE et al., 1995; MICHIHARA et al., 2002). Segundo Yamori e colaboradores (1976), o uso destes animais como modelos de AVE, mimetizando a enfermidade em humanos é plausível pela semelhança nos locais de infarto cerebral entre as espécies no córtex e nos gânglio basais.

Estes animais apresentam ataques isquêmicos transitórios e acidente vascular encefálico hemorrágico e isquêmico, exibindo sintomas similares aos humanos incluindo fraqueza nos membros (MINAMI; TOGASHI; KOIKE, 1985). De acordo com Yamagata (2011), 95% desta linhagem morre devido ao AVE.

O surgimento desta linhagem remonta ao final da década de 50 (1959), quando os ratos da linhagem normotensa, Wistar Kyoto (WKY), que começavam a apresentar pressão arterial elevada eram isolados de sua linhagem e reproduzidos com ratos que apresentavam esta mesma característica. Então, a partir de 1971, uma nova linhagem foi estabelecida e utilizada para estudos de hipertensão arterial: a linhagem SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). Assim, através de cruzamentos

não seletivos de SHR originou-se em 1974, a linhagem espontaneamente propensa ao AVE: os ratos SHRSP (OKAMOTO; YAMORI; NAGOAKA, 1974).

A linhagem SHRSP apresenta uma sensibilidade aumentada à isquemia e elevado volume de infarto cerebral quando comparados com ratos normotensos (Wistar). Segundo Carswell e colaboradores (1999), a reduzida circulação colateral cerebral entre a artéria cerebral média e anterior e as artérias posteriores, se deve ao reduzido diâmetro das mesmas e a falta de capacidade de dilatação, promovendo assim, a suscetibilidade ao AVE. Outras evidências ainda demonstraram os altos valores de glutamato encontrados nos SHRSP quando comparados aos ratos normotensos, reforçando assim, a maior sensibilidade a apoptose pelo AVE.

Em adição, os ratos SHRSP apresentam valores pressóricos próximos a 250 ± 15 mmHg na 8ª semana de vida e 300 ± 15 mmHg na 18ª semana. Em contraste, a linhagem SHR apresenta 180 ± 10 mmHg na 12ª semana e os ratos da linhagem Wistar apresentam 140 ± 5 mmHg desde a 6ª até a 30ª semana de vida (VIANNA; PAIVA; PAIVA, 1992; FUKUDA; TSUCHIKURA; IIDA, 2004). Alguns autores ainda relataram que os SHRSP machos têm uma vida curta (entre 33 e 41 semanas), apresentando consideráveis acidentes vasculares cerebrais plurifocais (ZS-NAGY et al., 1989).

Estes animais também apresentam geração aumentada de ânions superóxidos e radicais hidroxilas (KISHI; HIROOKA; KIMURA, 2004), sendo esta produção excessiva de radicais livres associada à manutenção da hipertensão (MCINTRE; HAMILTON; REES, 1997).



Figura 4: Rato SHRSP

Alterações nas *tight junctions* de ratos SHRSP nas idades precoces apontam para um aumento na suscetibilidade da disfunção da barreira hemato-encefálica e AVE (BAILEY et al., 2011). Além disso, esse aumento da sensibilidade à isquemia cerebral pode não ser relacionada à hipertensão, porque as linhagens SHR e SHRSP podem apresentar isquemias com 5 semanas de idade antes da hipertensão e hipertrofia vascular serem totalmente estabelecidas. Outros estudos têm sugerido que a suscetibilidade ao infarto cerebral é um traço hereditário autossômico recessivo que promove diminuição no diâmetro luminal de arteríolas cerebrais nas anastomoses vasculares entre a artéria cerebral média e a artéria cerebral anterior (GRATTON et al., 1998).

Schreiber e colaboradores (2011), também relataram que o acúmulo de hemácias seguidos por distúrbios da barreira-hematoencefálica nos SHRSP, aumentam com a idade. Microtromboses, infarto de tecido cerebral promovido pela redução do fluxo sanguíneo cerebral e a alterada entrada de potássio na célula, representam o estágio final da fisiopatologia vascular nos ratos SHRSP.

A classe B de receptores do gene CD 36, um receptor para LDL-oxidada, pode mediar a produção de radicais livres e a lesão neuronal na isquemia cerebral.

Pesquisas na área relataram que a expressão do gene CD36 foi aumentada em animais SHRSP com alterações da barreira hematoencefálica na região do hipocampo e foi principalmente identificada no citoplasma da região das células perivasculares da micróglia, sugerindo um papel deste gene na lesão neuronal por AVE (UENO et al., 2011).

Outros autores indicaram que a partir da 6ª semana de idade, vários genes reguladores da pressão arterial, incluindo *sparc/osteonectina* (Spock2), *quinureninase* (Kynu), *regulador da sinalização da proteína-G2* (Rgs2), e *regulador da proteína α 1 da gap junction* (Gja1) foram identificados como “up-regulated” e outros genes como a *urotensina 2* (Uts2), *hidrolase epóxido citoplasmático 2* (Ephx2), *apelina* (Apln), *receptor de Insulin-like growth factor 1* (Igf1r) e *proteína associada ao receptor angiotensina II* (Agtrap) estão “down-regulated”. Destes genes, o Kynu e Ephx2 têm sido reportados previamente por diferentes ensaios como possíveis responsáveis pela hipertensão espontânea em ratos (ASHENAGAR et al., 2010).

Os ratos SHRSP são considerados modelos animais para estudo de cognição devido aos danos cerebrais em áreas que processam a memória. Estudos demonstraram que o aumento da viscosidade sanguínea, hematócrito e fibrinogênio pode produzir a formação de trombos e induzir infartos cerebrais do hipocampo, levando ao prejuízo na conservação da memória. Alguns achados histopatológicos em cérebros humanos, causados pela doença cerebrovascular, são muito semelhantes aos observados nos SHRSP (KIMURA et al., 2000).

Esta linhagem ao ser acometida de AVE crônico ou ataques isquêmicos transitórios exhibe prejuízo no aprendizado e memória, que pode ser devido a degeneração edematosa cortical (YAMAGUCHI et al., 1994).

Outros autores indicaram que a diminuição nos níveis de acetilcolina no hipocampo para SHRSP a partir de 40 semanas de idade, foi acompanhada por insuficiência de desempenho em tarefa específica de repetição. Também foram encontradas liberação anormal de acetilcolina no hipocampo em ratos com 15 a 20 semanas de idade em resposta a estimulação repetitiva de potássio (TOGASHI et al., 1996).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

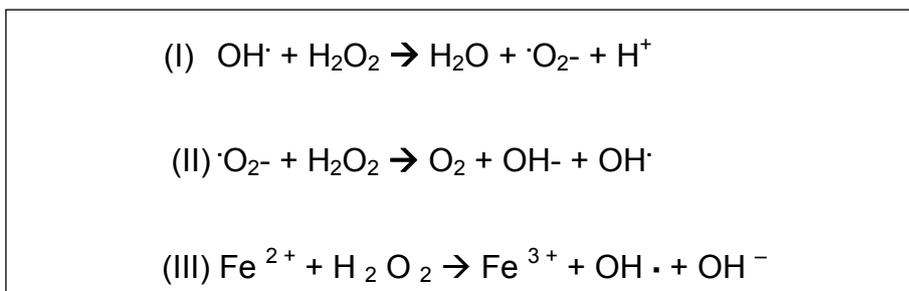
A oxidação é um processo bioquímico de perda de elétrons associado com outro de recepção chamado redução. Este processo é importante, pois, está diretamente envolvido na produção de energia celular (ELEJALDE-GUERRA, 2001). Contudo, a ação de agentes oxidativos em moléculas biológicas é conhecida como estresse oxidativo (SHILS; OLSON; SHIKE, 2003). Este é causado pelo desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a incapacidade do sistema biológico para desintoxicar essas espécies e reparar o dano resultante. Os efeitos do estresse oxidativo dependem do seu impacto no sistema celular e da capacidade antioxidante do mesmo. No entanto, processos oxidativos elevados podem causar necrose, depleção de ATP e morte apoptótica (SHUKLA; MISHRA; PANT, 2011).

Os radicais livres, são espécies químicas reativas que diferem de outros componentes por terem elétrons desemparelhados nos seus orbitais externos

(SOUTHORN; POWIS, 1988), podendo ocorrer em formas orgânicas e inorgânicas (FREEMAN; CRAPO, 1982). Os radicais de oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila e radicais peróxi), as espécies reativas de oxigênio não-radical, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, bem como os radicais de carbono, nitrogênio e enxofre compreendem esta variedade de moléculas que podem levar a um estresse celular (SLATER, 1994; CARDENAS, 1989).

Em relação as espécies reativas de oxigênio existem dois tipos: as menos reativas e as agressivas. A maioria destas espécies menos reativas são produzidas em um nível baixo pelo metabolismo aeróbico normal, e os danos causados por elas são constantemente reparados. No entanto, em alguns casos, as espécies menos reativas como o superóxido, são prontamente convertidos, por reações de oxirredução com metais de transição ou outros compostos redox, em espécies mais agressivas (SHUKLA; MISHRA; PANT, 2011).

A reação em cadeia de processos produtivos de espécies reativas de oxigênio foi primeiramente mencionada por Haber e Willstatter em 1931. Em 1949, Weiss aceitou a reação proposta, desde então conhecida como reação de Haber-Weiss (Figura 5) (KOPPENOL, 2001).



Legenda: I e II Reação de Haber-Weiss; III Reação de Fenton

Figura 5: Formação de espécies reativas de oxigênio

Em 1968, McCord e Fridovich demonstraram que a xantina-oxidase é uma enzima essencial para catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (McCORD; FRIDOVICH, 1968). Em seguida, no ano de 1969, estes autores apresentaram, a superóxido dismutase, como inativadora de oxirradicais e indicaram que esta enzima é largamente distribuída entre organismos mamíferos (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

Evidências ainda afirmaram que nas células animais, os radicais livres promovem alterações estruturais importantes. As hidroxilas (OH⁻) podem reagir com carboidratos abstraindo aleatoriamente um átomo de hidrogênio a partir de um dos átomos de carbono, produzindo um radical centrado no carbono (SHILS; OLSON; SHIKE, 2003). Esta reação resulta em quebras de cadeias de importantes moléculas. O mesmo acontece às proteínas que apresentam muitos sítios reativos e podem ser danificados durante o estresse oxidativo. Radicais livres muito agressivos como hidroxila (OH⁻) podem fragmentar também proteínas no plasma (WOLFF; DEAN, 1986). Outra molécula afetada é o ácido nucléico, cuja estimativa prevê que o dano oxidativo ao DNA, em humanos, corresponda a 104 impactos por célula ao dia (FRAGA; SHIGENAGA; PARK, 1990).

Os lipídios por sua vez, ao serem oxidados caracterizam a peroxidação lipídica, processo em que os lipídios poliinsaturados, constituintes importantes de membranas celulares, são oxidados (GARDNER, 1989). Este processo constitui uma reação em cadeia iniciada por radical e que se autopropaga em membranas celulares. Conseqüentemente, eventos oxidativos isolados podem apresentar efeitos profundos na função da membrana (WITZ, 1989).

Neste contexto, Nanetti e colaboradores (2011) indicaram importantes considerações a cerca do estresse oxidativo no processo do AVE. Os autores relataram que uma alteração no equilíbrio fisiológico entre produção e degradação de atividade enzimática envolvida na regulação do estado oxidativo pode desempenhar um papel nos resultados da condição isquêmica. Um recente estudo propôs que a isquemia cerebral causa a liberação de óxido nítrico no endotélio vascular e a reação com o oxigênio leva à produção de peroxinitrito, um radical livre altamente reativo. O superóxido e a hidroxila, formados através do processo de restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), reagem com lipídios insaturados das biomembranas, que resultam na geração de radicais peróxido-lipídicos, hidroperóxidos lipídicos e produtos de fragmentação, como malondialdeído (MDA) e dienos conjugados.

Adicionalmente, um conjunto substancial de evidências sugerem que as espécies reativas de oxigênio lesam uma série de organelas interrompendo a integridade celular durante o processo de reperfusão. Além disso, estas espécies, através do estresse oxidativo, estão envolvidas com processos apoptóticos. Vários

estudos têm revelado que muitos neurônios na penumbra isquêmica podem sofrer apoptose após várias horas ou dias, e portanto, são passíveis de recuperação após o início do AVE. Autores ainda citam que a apoptose pode ser responsável por até 50% da morte celular durante a isquemia (RAZA et al., 2011).

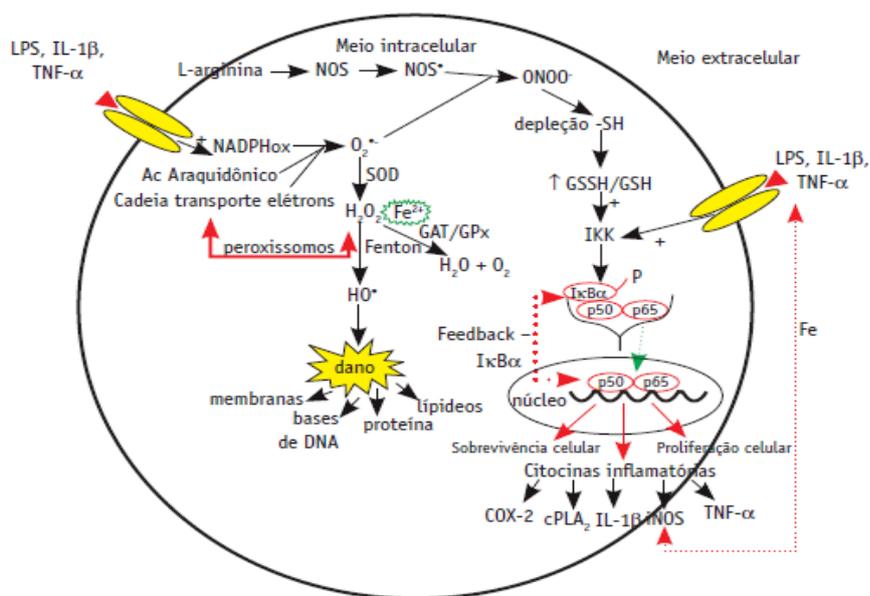


Figura 6: Fluxograma esquemático do dano celular pelo estresse oxidativo (Retirado de Fillipin et al., 2008)

3.7 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado e constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (BECKMAM; KOPPENOL, 1996). Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (JAMES, 1995). Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos cardiovasculares, neurológicos e do sistema imune (LOWENSTEIN; DINERMAN; SNYDER, 1994).

De acordo com Barreto, Correia e Muscara (2005), a importância fisiológica deve-se ao fato do NO poder atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvidas em diversos processos como a regulação do tônus vascular, controle imunológico da relação patógeno-

hospedeiro e neurotransmissão. Diferentemente de outros mensageiros químicos, o NO não depende de sua “topologia” estrutural para se ligar a um receptor ou enzima, mas necessita de sua reatividade redox. Ademais, o NO não é armazenado *in vivo* como outros neurotransmissores, mas sintetizado sobre demanda, difundindo-se rapidamente até seu sítio de ação.

O NO é formado através do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas: as NOS sintases (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997). Em termos estruturais e funcionais, a família da NOS compreende três isoenzimas distintas: as isoformas endotelial (eNOS ou NOS-III) e neuronal (nNOS ou NOS-I), ambas constitutivas e dependentes de Ca^{2+} -calmodulina (CaM), e uma isoforma induzível (iNOS ou NOS-II). Estas três isoenzimas apresentam grande homologia estrutural, podendo ser divididas em dois domínios: um redutor, na parte C-terminal, e outro oxidante, na parte N-terminal. No domínio redutor estão os sítio de ligação para o NADPH e os co-fatores FAD e FMN, os quais transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o BH₄ (tetrahydrobiopterina) e o substrato L-Arg (MONCADA, 1991; MARLETTA, 1994).

Castillo, Rama e Dávalos (2000) relataram que o NO desempenha um papel no controle do fluxo sanguíneo cerebral, trombogênese e modulação da atividade neuronal. A formação de NO nas células do endotélio vascular responde a estímulos químicos e físicos, tais como a tensão de cisalhamento. Este mecanismo secretor de NO mantém um efeito vasodilatador que é essencial para a regulação de fluxo e pressão sanguínea (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997). Adicionalmente, tem sido demonstrado, que o óxido nítrico é capaz de inibir a proliferação da camada muscular e reduzir a agregação plaquetária através da elevação da GMPc e da diminuição do Ca^{++} intraplaquetário, além de inibir a adesão leucocitária (MONCADA; HIGGS, 1993).

Um estímulo proliferativo é o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Nesse processo, as células da camada muscular apresentam alterações importantes da sua função, com perda da atividade contrátil. As células musculares podem migrar para a íntima, contribuindo para a hiperplasia desta. Tem sido demonstrado que o NO produzido pelo endotélio vascular ou oriundo de doadores exógenos é capaz de inibir a proliferação da camada muscular, embora o

mecanismo de atividade antiproliferativa não esteja completamente esclarecido (GEWALTIG; KOJDA, 2002).

No sistema nervoso central, o NO é sintetizado nos neurônios onde age como um neuromediador de várias funções fisiológicas, incluindo a formação da memória, coordenação neural sobre a atividade e fluxo sanguíneo e modulação da dor (SNYDER; BREDT, 1992). Estas ações fisiológicas do NO são mediadas pela ativação da guanilase ciclase solúvel e o consequente aumento na concentração da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) na célula-alvo (MURAD et al., 1990).

Evidências também sugerem que o NO tem sua ação iniciada pelo glutamato. Este aminoácido difunde-se na fenda sináptica, ligando-se aos receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) no terminal pós-sináptico. Estes receptores estão acoplados a canais de íons cálcio e sua ativação permite o fluxo de Ca^{2+} para o interior do terminal pós-sináptico, onde o Ca^{2+} se associa à calmodulina e ativa a enzima NO sintase neuronal, promovendo a formação de NO. Assim, existem diferentes proposições de como o NO pode exercer sua função neurotransmissora. Autores têm sugerido que o NO se difunde até o terminal pré-sináptico e estimula a formação de GMPc a partir de guanosina. Assim, o GMPc desencadeia então o processo de fosforilação pelas proteína-cinases (BARRETO; CORREIA; MUSCARA, 2005).

Diversos estudos comportamentais também demonstraram o envolvimento de óxido nítrico no processo de formação de memória e o bloqueio do aprendizado quando utilizados inibidores de NOS. O NO pode participar da plasticidade sináptica, incluindo potenciação de longa duração no hipocampo. Outros autores ainda afirmam que o NO desempenha um papel importante durante a aquisição da memória, mas não na retenção da mesma (ALAMI et al., 2011). Zou e colaboradores (1998), ainda afirmaram que o NO desempenha um papel importante na formação da memória espacial.

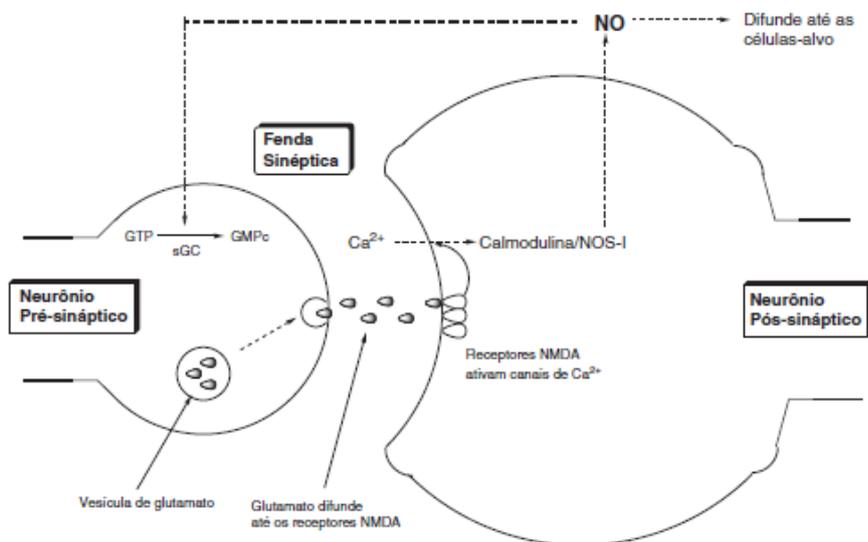


Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de ação do NO atuando como neurotransmissor (Retirado de Barreto, Correia e Muscara, 2005)

Não obstante, assim como acontece com qualquer outra molécula mensageira, uma alteração nos níveis de concentração do NO endógeno (deficiência ou excesso), pode ser a causa de vários processos fisiopatológicos. Em alguns casos, a deficiência na produção de NO pode resultar em hipertensão, angina e impotência, em outros, sua superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias severas, sepse, choque circulatório ou até mesmo infarto. O óxido nítrico também pode reagir com radicais superóxidos, produzidos durante AVE, gerando um radical extremamente tóxico: o peroxinitrito, que tem efeitos deletérios sobre lipídios, proteínas celulares e sobre o DNA, podendo agravar as lesões neuronais (SOUTHAN; SZABÓ, 1996).

Neste sentido, um aumento na produção de óxido nítrico (NO) no cérebro tem sido demonstrado durante a isquemia cerebral. Evidências sugerem que ambas as formas neuronal e endotelial geram óxido nítrico no início da isquemia. Embora a produção de NO endotelial seja realizada para afetar positivamente o resultado da isquemia, melhorando o fluxo sanguíneo, a superprodução de óxido nítrico, no parênquima cerebral tem contribuído para o dano tecidual. O NO pode ser tóxico através de vários mecanismos, no entanto, a formação de peroxinitrito após uma reação com entre NO e superóxido parece ser uma das principais vias que levam à morte celular (GURSOY-OZDEMIR et al., 2000). O radical peroxinitrito é um oxidante

poderoso, com uma meia-vida relativamente longa e é mais tóxico que o próprio NO e o superóxido. Assim, o peroxinitrito foi proposto como um dos mediadores putativos da lesão celular por reperfusão (GURSOY-OZDEMIR et al., 2000).

Nesse sentido, emergem duas abordagens terapêuticas distintas para o tratamento destas doenças. No caso da superprodução de NO, a utilização de inibidores da NO sintase (NOS), enzima responsável pela sua biossíntese, pode diminuir sua biodisponibilidade, enquanto que, na sua falta, o uso de doadores de NO pode elevar sua biodisponibilidade (BARRETO; CORREIA; MUSCARA, 2005).

3.8 N-NITRO L-ARGININA METIL-ÉSTER (L-NAME)

A síntese da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (isoformas endotelial e neuronal) pode ser bloqueada por análogos da L-arginina, tais como: N-nitro-L-arginina (L-NOARG), NG-monometil-L-arginina ou N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da cNOS.

A administração aguda destes inibidores da cNOS, especialmente sobre a isoforma eNOS, provoca em modelos animais a elevação da pressão arterial, sendo amplamente utilizada para estudos experimentais sobre hipertensão arterial (SEKIGUCHI et al., 2002). O óxido nítrico derivado do endotélio (EDNO) desempenha um papel importante na regulação da contração e tônus do músculo liso vascular. Este é sintetizado eNOS, situada no endotélio, que ativa a guanilil-ciclase solúvel. Em seguida, o nível de guanosina 3' e 5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico) no endotélio vascular aumenta, apontando para o relaxamento.

Conseqüentemente, a indução da hipertensão por meio da utilização do L-NAME leva a uma hipertrofia e remodelação das arteríolas cerebrais de ratos, podendo levar ao desenvolvimento de ataques isquêmicos transitórios e AVE. (CHILLON; BAUMBACH, 2004). Além disso, alguns trabalhos sugerem que a longo-prazo a inibição do eNOS pode aumentar a trombogenicidade arterial pelo menos em parte, através de uma cascata de reações que aumentam a geração da trombina (KUBO-INOUE et al., 2002).

Em adição Takinishi, Okazaki e Oguchi (2005), relataram que o administração de L-NAME pode aumentar os níveis de fibrinogênio plasmático via aumento da expressão de fibrinogênio no mRNA hepático. Moore, Sanz-rosa e Emerson (2011), reforçaram a hipótese de indução de tromboembolismo do L-NAME ao descrever o aumento da agregação plaquetária induzida pelo colágeno em animais submetidos a este inibidor da cNOS. Contudo, o L-NAME não apresenta apenas efeitos nocivos no sistema vascular. Por apresentar efeito inibidor na isoforma óxido nítrico sintase neuronal, Majlessi e colaboradores (2008) constataram comprometimento na realização de testes de memória espacial, o que indicou que os processos mediados pela síntese de óxido nítrico no hipocampo são essencialmente envolvidos na aprendizagem espacial.

Mishima e colaboradores (2003) demonstraram que a lenta geração de NO, por administração de L-NAME, pode gerar perda de memória espacial e induzir a apoptose células hipocampais de ratos submetidos a repetidas isquemias.

Outros trabalhos demonstraram que animais tratados com L-NAME possuíam dificuldades em cumprir tarefas que demandassem memória e orientação espacial, e que este prejuízo no cumprimento da tarefa era revertido após administração de L-arginina (MAJLESSI et al., 2003).

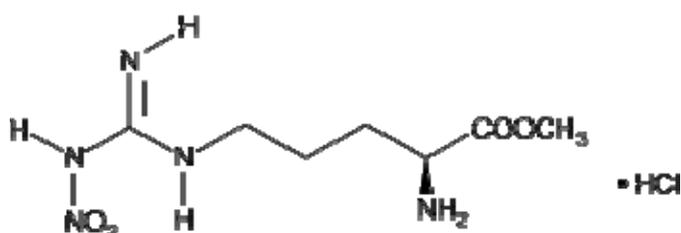


Figura 8: Representação química do N-Nitro L-Arginina metil-éster hidrocloreídrico

3.9 VITAMINA E

A vitamina E foi descoberta em 1922, quando experimentos conduzidos com ratos mantidos em uma dieta semi-purificada contendo todas as vitaminas então conhecidas, indicaram falha no processo reprodutivo. Contudo, a reabsorção do feto foi impedido pela alimentação de alface, o que implicou na adição de mais um

nutriente, desconhecido naquele momento. Nos anos seguintes, a deficiência deste nutriente foi demonstrada como causa de esterilidade em ratos, encefalomalácia em galináceos e distrofia muscular em outros animais. A substância ativa foi isolada em 1936 por Evans que a denominou “tocoferol”, termo de origem grega que significa “para ter filhos” (LEMAIRE-EWING et al., 2010).

Na realidade, a nomenclatura “vitamina E” designa oito vitâmeros, cada um compreendendo um anel 6-cromanol e um lado com cadeia poli-isopentenil, que pode ser tanto saturadas (tocoferóis) ou insaturados com três duplas ligações, nas posições 3, 7 e 11 (Tocotrienóis). Na natureza existem, quatro tocoferóis (α , β , δ , γ) e quatro tocotrienóis (α , β , δ , γ), cada um designado de acordo com a posição e o número de grupo metil no anel fenólico. Assim, os vitâmeros de tocoferol e tocotrienol α , β , δ e γ , possuem respectivamente três, dois, dois e um grupos metil (LEMAIRE-EWING et al., 2010).

A Comissão da IUPAC-IUB para Nomenclatura Bioquímica recomendou que o termo Vitamina E seja usado como uma descrição genérica de todos tocoferóis e tocotrienóis que exibam a atividade biológica do alfa-tocoferol. Ainda em relação a nomenclaturas, o estereoisômero natural do alfa-tocoferol é o (2R, 4'R, 8'R)-alfa-tocoferol ou a representação RRR-alfa-tocoferol (WANG; QUINN, 1999).

Curiosamente, o alfa-tocoferol e sua forma natural RRR-isômero é a única forma reconhecida com alta seletividade pela proteína transferidora de alfa-tocoferol (alfa-TPP) hepática. Em adição, é descrito na literatura que a proteína ligadora de tocoferol tem diferentes afinidades para a ligação com diferentes isômeros do tocoferol, seguindo a seguinte linha de afinidades: $\alpha > \beta > \delta > \gamma$ -tocoferol. Esta afinidade seletiva desencadeia a associação do α -tocoferol com as lipoproteínas e a posterior secreção de vitamina E na corrente sanguínea. Como consequência, alfa-tocoferol é o principal isômero encontrado no plasma e tecidos (WANG; QUINN, 1999; LEMAIRES-EWING et al., 2010).

Com relação às fontes alimentares, a vitamina E é encontrada no gérme de trigo e em seu óleo, assim como nos óleos de soja, arroz, algodão, milho, girassol, gema de ovo, vegetais folhosos e legumes. Os alimentos de origem animal são relativamente pobres em vitamina, com exceção da gema de ovo, fígado e o tecido adiposo animal (FRANCO, 2007).

Após a ingestão, a absorção da vitamina E necessita de ácidos biliares (secretados pelo fígado), ácidos graxos e monoglicérides (liberados da gordura alimentar por enzimas pancreáticas) para a formação da micela. Após a captação para o interior dos enterócitos do intestino, todas as formas dietéticas da vitamina E são incorporadas em quilomícrons, é são absorvidas na parte proximal do intestino (HERRERA; BARBAS, 2001). Embora a absorção intestinal tenha sido considerada por muito tempo como um processo passivo, recentemente, foi descoberto que este processo é mediado, pelo menos em parte, pelo receptor classe B membro 1 (SR-BI), uma glicoproteína transmembrana que medeia a absorção seletiva de ésteres de colesterol associados ao HDL, especialmente no fígado e tecidos esteroideogênicos.

O SR-BI têm demonstrado suma importância no processo de ligação e transferência do alfa-tocoferol. Estudos demonstraram que ratos com fenótipo deficiente em SR-BI apresentaram redução de 70% na concentração de alfa-tocoferol no cérebro destes animais, sugerindo um papel do SR-BI na absorção de alfa-tocoferol através da barreira hemato-encefálica (LEMAIRE-EWING et al., 2010).

Após a absorção, tocoferóis são re-secretados do lado basal dos enterócitos como parte dos quilomícrons. A secreção de vitamina E nos quilomícrons requer a *proteína funcional de transferência microssomal de triglicerídeos*, enquanto a secreção em HDL envolve o *transportador transmembrânico ligante de ATP cassete-A1* (ABCA1) Desta forma, após a hidrólise pela lipase lipoproteica (LPL), quilomícrons remanescentes contendo Vitamina E são capturados pelo fígado, via interação com a apolipoproteína E com receptor de LDL. Nos hepatócitos, a *proteína transferidora de alfa-tocoferol* (alfa-TTP), é responsável pela re-secreção desta vitamina no compartimento plasmático (LEMAIRE-EWING et al., 2010).

Por outro lado, ao contrário da alfa-TTP, os *transportadores associados ao processamento de antígenos* (TAPs), podem ligar os quatro tipos dos análogos do tocoferol, bem como tocotrienóis e uma série de ligantes, tais como esqualenos, fosfatidilinositol e fosfadilcolina. Apesar de seu papel na ligação e transporte da Vitamina E não estar elucidado, os subtipos TAP 1 e TAP 2 podem estar envolvidos no transporte intracelular do alfa-tocoferol para a mitocôndria. Esta observação sugere que os TAPs pode desempenhar uma função no transporte para os compartimentos subcelulares (LEMAIRE-EWING et al., 2010).

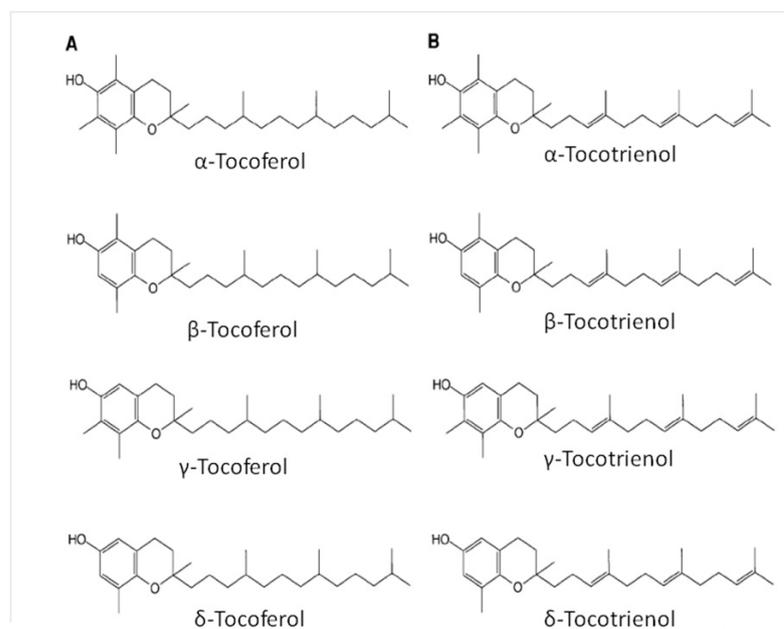


Figura 9: Representação química dos isômeros da Vitamina E (Modificado de Traber e Atkinson, 2007)

Quanto ao transporte e distribuição da vitamina E em compartimentos aquosos, a hidrofobicidade é uma grande limitação, e seus isômeros não podem se distribuir como monômeros livres na corrente sanguínea, requerendo associação com lipoproteínas para se deslocar e distribuir para os tecidos periféricos (LEMAIRE-EWING et al., 2010). Assim, quando os quilomícrons são secretadas na circulação, onde ocorre a lipólise pela lipase de lipoproteínas (LPL) ligadas à camada endotelial das paredes dos capilares. Os remanescentes dos quilomícrons resultantes são captados principalmente pelo fígado. Durante a lipólise, várias formas de vitamina E podem ser transferidas aos tecidos ou a lipoproteínas de alta densidade (HDL). A vitamina E pode ser trocada entre a HDL e outras lipoproteínas circulantes, que podem, também, liberar a vitamina E para os tecidos periféricos (HERRERA; BARBAS, 2001).

Neste contexto, a literatura demonstra que a lipoproteína que carrega a maior parte da Vitamina E é a fração LDL, contudo, outras frações também contêm a Vitamina E. A partícula de LDL contém entre 6 a 12 moléculas de alfa-tocoferol e menores quantidades de gama-tocoferol. A estrutura de LDL consiste de uma monocamada de fosfolípidios e proteínas, na superfície e um núcleo de lípidos

neutros incluindo ésteres de colesterol. O tocoferol é encontrado dentro da superfície da monocamada de fosfolipídios (WANG; QUINN, 1999).

Nas células, uma observação superficial revela uma homologia notável entre a estrutura do alfa-tocoferol e do colesterol, sendo que ambas moléculas ficam ancoradas na interface aquosa da membrana celular por um grupo hidroxila (OH) (WANG; QUINN, 1999).

Na membrana celular, a extremidade distal (C9 da cadeia isoprenóide) do tocoferol está centrada no meio da membrana e com ampla distribuição de quase 1 angström. Desta maneira, sugere-se que o tocoferol está posicionado verticalmente, com o grupo hidroxila logo acima do primeiro carbono da cadeia acil 18:1-18:1 da fosfatidilcolina (PC) (ATKINSON et al., 2010).

No modelo proposto por Atkinson e colaboradores (2010) (Figura 10), o grupo metil na região C5 do anel cromanol e o metil na região C9 na cadeia lateral constroem uma ilustração da localização desta vitamina nas regiões 16:0-18:1 e 18:01-18:01 da fosfatidilcolina. Este modelo demonstra uma conformação possível, colocando o grupo do C9 no centro da bicamada fosfolipídica.

Na hipótese colocada por Atkinson e colaboradores (2010), o alfa-tocoferol é incorporado preferencialmente em domínios ricos em ácidos graxos poliinsaturados, que possuem maior suscetibilidade para oxidação. Esta co-localização da vitamina E pode produzir uma otimização na proteção das membranas de eventos oxidativos deletérios e posterior destruição funcional.

Nas membranas subcelulares, as maiores concentrações de alfa-tocoferol foram encontradas nas membranas do Complexo de Golgi e nos lisossomos. A razão molar de alfa-tocoferol:fosfolipídios encontrada nessas membranas foi na ordem de 1:65 moléculas de fosfolipídios, isto representa uma ordem de magnitude maior que a encontrada em outras membranas subcelulares (WANG; QUINN, 1999).

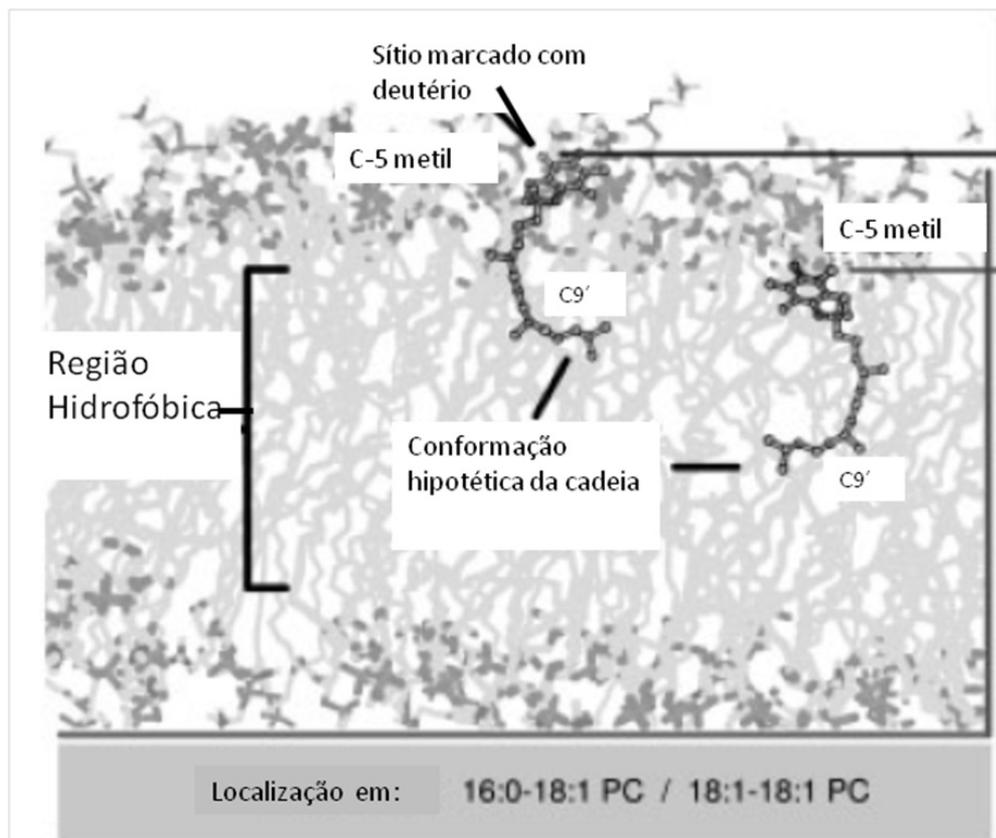


Figura 10: Representação gráfica da localização do alfa-tocoferol na membrana plasmática (Modificado de Atkinson et al., 2010)

Nas membranas subcelulares, as maiores concentrações de alfa-tocoferol foram encontradas nas membranas do Complexo de Golgi e nos lisossomos. A razão molar de alfa-tocoferol:fosfolipídios encontrada nessas membranas foi na ordem de 1:65 moléculas de fosfolipídios, isto representa uma ordem de magnitude maior que a encontrada em outras membranas subcelulares (WANG; QUINN, 1999).

A concentração de tocoferóis varia de tecido para tecido. Os níveis de diferentes isômeros de tocoferol no coração e fígado de modelos experimentais animais foram aferidos por Kramer, Fouchard e Kallury (1999), sendo a maior concentração encontrada a do isômero alfa-tocoferol e as menores concentrações do alfa-tocotrienol e gamma-tocoferol.

No cérebro concentrações significantes de vitamina E foram encontradas, mesmo após privação de vitamina E, enquanto houve severa depleção nos tecidos periféricos, indicando maior resistência a deficiência de vitamina E do que em outros tecidos (VATASSERY; ANGERHOFER; PETERSON, 1984).

A deficiência de Vitamina E, dentre outras reações menos estabelecidas e importantes, é caracterizada como ataxia por deficiência de Vitamina E (AVED). Curiosamente, os sintomas observados nesta ataxia são semelhantes as observadas na ataxia de Friedreich (TRABER; ATKINSON, 2007).

Quanto à metabolização da Vitamina E, cerca de um terço do alfa-tocoferol não é absorvido e é excretado nas fezes. O alfa-tocoferol pode ser excretado na bile em sua forma natural, por um processo que envolve transportadores ABC localizados nas membranas canaliculares dos hepatócitos. Os metabólitos da vitamina E são os CEHC (2'-carboxietil-6-hidroxicromanol) produtos das respectivas formas de vitamina E, α -, β -, γ - e δ -CEHC. As formas diversas desta vitamina são ω -oxidados pelo citocromo P450s(CYPs), seguindo com a β -oxidação e então conjugadas. A conjugação dos CEHCs acontece sob a forma de sulfatação ou glucuronação, e então, os CEHCs são excretados na urina e bile (TRABER; ATKINSON, 2007).

No que se refere à toxicidade, a vitamina E é uma das menos tóxicas. Após anos de pesquisas com altas doses desta vitamina, foi provado que é uma vitamina não mutagênica e não teratogênica (EMMERT; KIRCHNER, 1999). Contudo, em altas doses, pode haver uma interação desta vitamina com o retinal (CHING et al., 2002) promovendo a ação pró-oxidante da mesma (HODIS et al., 2002).

Por outro lado, as ações antioxidantes da vitamina E tem sido amplamente estudadas. Assim, ela atua nas células protegendo os ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA do dano oxidativo (IKEDA; NEGISHI; YAMORI, 2003).

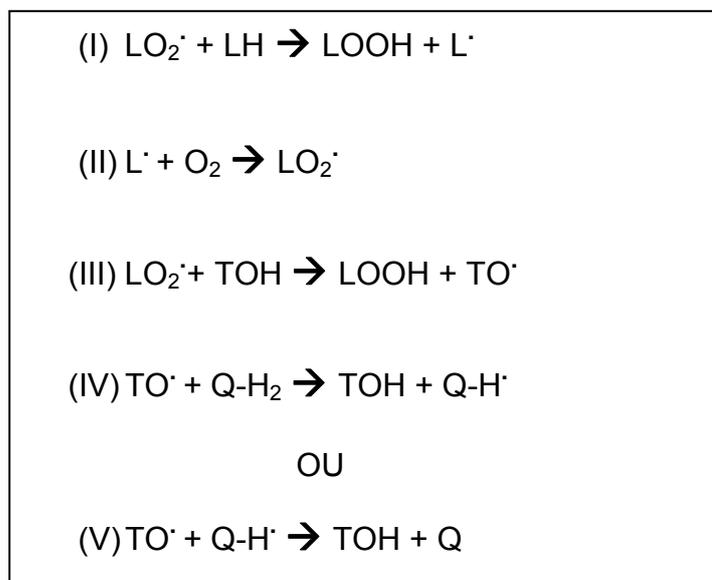
Ao contrário de muitos outros antioxidantes celulares que são enzimas constituintes ou sistemas enzima-dependentes, a reação antioxidante do alfa-tocoferol é não-enzimática e rápida. O papel principal do alfa-tocoferol como um antioxidante é creditado à função de varredura dos radicais lipídicos peroxila, que são as espécies da cadeia de transporte oxidante e propagam a peroxidação lipídica. Desta maneira, a oxidação de lipídios é vista como um processo mediado pela reação em cadeia de radicais livres. A propagação da cadeia ocorre pela abstração de um átomo de hidrogênio, a partir da reação de lipídios-alvo pelo radical peroxila. Os radicais livres de lipídios ainda podem reagir com o oxigênio molecular para gerar outro radical lipídico peroxila e produzir outras reações em cadeia (WANG; QUINN, 1999).

Assim, o alfa-tocoferol funciona como um inibidor dos radicais peroxila, a partir da doação de um elétron que estabiliza o radical, antes que seja iniciada uma reação em cadeia. Em estudos *in vitro*, a medição desta inibição dos radicais peroxila pelo alfa-tocoferol indicou que esta reação é consideravelmente mais rápida que a taxa de reação entre o radical peroxila e o substrato lipídico. Os tocoferóis também reagem com outras formas oxidativas, incluindo o oxigênio singlete, os radicais alcoxil, peroxinitrito, dióxido de nitrogênio, ozônio e superóxido (WANG; QUINN, 1999).

Porém, como qualquer componente redox-ativo, a vitamina E pode exercer além da função antioxidante, uma função pró-oxidante, dependendo da reação presente (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999). Esta função pode ser desencadeada através da co-regulação do metabolismo ou da absorção de antioxidantes, onde a carência de outros antioxidantes pode acarretar na ação pró-oxidante da vitamina E (HODIS et al., 2002).

Adicionalmente, quando um radical livre inicia uma reação com ácidos graxos poliinsaturados, presentes na membrana fosfolipídica, estes lipídios perdem um hidrogênio pela reação com o radical, sendo convertidos em radicais livres de ácidos graxos poliinsaturados. Estes radicais podem iniciar uma reação com outros ácidos graxos, transformando-os em radicais peroxil. A repetição deste processo constitui uma reação em cadeia de radicais livres. A reação desta estrutura com o tocoferol resulta na produção de ácidos graxos poliinsaturados hidróxido peróxido (AGPI-OOH) e radical tocoferol. Estes dois compostos formados podem reagir entre si e formar novamente um radical livre de ácido graxo poliinsaturado. Esta reação constitui o mecanismo pró-oxidante das ações do alfa-tocoferol. Entretanto, esta ação pró-oxidante é suprimida quando o radical de tocoferol é regenerado através de outros antioxidantes, como a vitamina C e a coenzima Q10 (HERRERA; BARBAS, 2001).

Contudo, essa vitamina não participa apenas da manutenção e prevenção de desequilíbrios oxidantes. A vitamina E também está associada à diminuição da pressão arterial sanguínea, adesão e agregação plaquetária e redução dos marcadores inflamatórios e marcadores da peroxidação lipídica (KEANEY; SIMON; FREEDMAN, 1999; PRATICO, 2005), além da modulação do perfil lipídico (HODIS et al., 2002) e inibição da atividade da proteína kinase C (OZER, 1993).



Legenda. $\text{LO}_2\cdot$ - radical peroxila lipídico / LH - alvo lipídico / LOOH - hidroperóxido lipídico / $\text{L}\cdot$ - radical lipídico / TOH - alfa-tocoferol / $\text{TO}\cdot$ - radical alfa-tocoferoxil / Q-H₂ - forma reduzida de coenzima Q10 / Q-H \cdot - forma semi-reduzida da Coenzima Q10 ou ubisemiquinona/ Q - Coenzima Q10

Figura 11: Representação química da peroxidação lipídica e neutralização pelo alfa-tocoferol. Peroxidação lipídica e formação do radical lipídico (reação I); reação com o oxigênio e restauração do radical peroxila lipídico - “início da reação em cadeia” (reação II); neutralização do radical peroxila lipídico pelo alfa-tocoferol (reação III); reciclagem do alfa-tocoferol pela forma reduzida da coenzima Q10 (reação IV); e reciclagem do alfa-tocoferol pela forma semi-reduzida da coenzima Q10 (reação V)

Traber e Atkinson (2007) relataram que o alfa-tocoferol é descrito como um inibidor de proteína-quinase C (PKC) em vários tipos de células com consequente inibição da agregação plaquetária, aumento da expressão do óxido nítrico e da produção de superóxidos nos neutrófilos e macrófagos. De fato, foi demonstrado que o α -tocoferol atenua a translocação da p67 phox que suspende a produção de superóxido pelas células gliais através de um mecanismo mediado pela pkc. Além disso, o α -tocoferol pode prevenir a agregação plaquetária por meio de uma via pkc-dependente.

Outra via de ação não-antioxidante desta vitamina é relacionada as ciclooxigenases (prostaglandinas), que funcionam como inibidoras da secreção dos vasoconstritores como os tromboxanos. O ácido araquidônico, um ácido graxo de cadeia longa, é um precursor destas moléculas e a vitamina E desempenha um papel fundamental na disponibilidade deste ácido, aparentemente pela regulação

citossólica da atividade da fosfolipase A2. Estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina E aumenta produção de prostaglandinas pelo aumento da disponibilidade do ácido araquidônico. A liberação de ácido araquidônico induzida pela vitamina E é devido a atividade e aos altos níveis de expressão da fosfolipase A2. Esta via é intrinsecamente relacionada a processos inflamatórios (TRABER; ATKINSON, 2007).

Apesar dos resultados promissores supracitados, em estudos epidemiológicos a Vitamina E apresenta resultados contrastantes. Na revisão sistemática de Jialal e Devaraj (2003), que utilizou 12 trabalhos de larga escala, 5 estudos demonstraram benefícios com o tratamento de antioxidantes e 7 não relaram sucesso associado ao uso de antioxidantes. O Cambridge Heart Antioxidant Study apresentou uma significativa redução de mortes cardiovasculares e de infarto do miocárdio, com a suplementação de alfa-tocoferol nas doses de 400 ou 800 UI por dia. O *Secondary Prevention With Antioxidant of Cardiovascular Disease In End Stage Renal Disease*, verificou que a administração de 800 UI por dia de alfa-tocoferol em pacientes em hemodiálise e com doença cardiovascular pré existente diminuiu o número de infartos do miocárdio (fatal e não fatal), de AVE isquêmico, de doença vascular periférica e de angina instável. O *Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study*, demonstrou que após 6 anos de suplementação com vitamina E e com vitamina C, houve uma redução na progressão de aterosclerose de carótida.

Os estudos *Heart Outcomes Prevention Evolution* e *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio* não demonstraram efeitos positivos com a suplementação de vitaminas antioxidantes, incluindo a vitamina E. No entanto, mais de 75% dos pacientes incluídos nesses estudos eram tratados com aspirina ou algum outro agente antiplaquetário, e muitos também recebiam β -bloqueadores, agentes hipocolesterolêmicos e bloqueadores do canal de cálcio. Assim, os efeitos esperados proveniente dos antioxidantes podem ter sido anulados (JIALAL; DEVARAJ, 2003).

Diferentemente dos estudos de larga escala, os estudos clínicos menores vêm mostrando respostas mais positivas em pacientes hipertensos tratados com antioxidantes, sendo em terapias em conjunto (zinco, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta caroteno e outros) como também em terapias isoladas (vitamina C ou vitamina

E). Estudos com humanos utilizando doses de 400 a 1000 UI por dia de vitamina E demonstraram efeitos benéficos na sensibilidade a insulina, na diminuição dos níveis séricos de glicose, no aumento intracelular de magnésio e na redução da resistência vascular (REDON et al., 2003; HOUSTON, 2005).

Dados de 1946 do estudo British Birth Cohort reportaram que a baixa ingestão de vitamina E durante a infância e na fase adulta foi um bom preditor da hipertensão arterial aos 43 anos de idade (MISHRA et al., 2003). Adicionalmente, Yachum, Folsom e Kushi (2000), observaram uma associação inversa entre a ingestão de vitamina E e o AVE fatal em mulheres pós-menopausadas.

A aparente incapacidade de prevenção de doenças, a partir de terapias com antioxidantes, pode ser atribuída a importantes razões. Uma delas é que por mais que a suplementação de antioxidantes possa ser benéfica por meio de uma metodologia aprovada contra o estresse oxidativo, não existem mecanismos para deduzir quem são os reais indivíduos que terão respostas para esse tipo de tratamento (JIALAL; DEVARAJ, 2003). É possível que o tratamento com vitamina E tenha um valor terapêutico apenas para os indivíduos com elevados níveis de estresse oxidativo.

Outra razão para a ineficácia dos antioxidantes pode ser relatada pela dose ótima e o tipo de antioxidante usado. Para essa questão, foram sugeridas como eficazes a dose de 800 UI por dia de alfa tocoferol (JIALAL; DEVARAJ, 2003). Além disso, a chave é a formulação do antioxidante utilizado. Cinco dos sete trabalhos que reportaram ineficácia da vitamina E, no estudo de revisão de Jialal e Devaraj (2003), utilizaram o all-rac-tocoferol (forma racêmica) e quatro trabalhos descreveram sucesso com o uso de RRR-tocoferol (forma natural).

Outra possível razão para um provável insucesso dos antioxidante pode ser devido a complexidade das reações redox "in vivo", como por exemplo, as vitaminas C e E que podem apresentar propriedades pró oxidantes (HALLIWELL, 2000). É capaz também que a administração oral de antioxidantes possa ser inacessível para as fontes de espécies reativas de oxigênio, particularmente se estes forem gerados em compartimentos intracelulares ou em organelas (CAI; GRIENDLING; HARRISON, 2003).

Portanto, nos estudos em humanos que obtiveram resultados negativos com o uso de agentes antioxidantes, nunca foi provado de fato que esses indivíduos

apresentavam um aumento do estresse oxidativo. Não há nenhum estudo em larga escala que tenha recrutado os indivíduos baseado em elevada formação de espécies reativas de oxigênio (PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

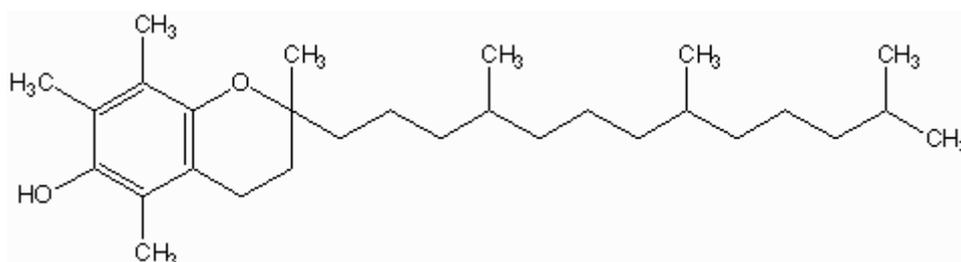


Figura 12: Representação química do alfa-tocoferol

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO ANIMAL

Foram utilizados vinte e quatro ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem SHRSP, machos, com quinze semanas de vida, pesando entre 195-230g, obtidos de colônias mantidas pelo Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação com animais (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1996). Todo o processo experimental foi conduzido no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas (LINDCD) e em seu respectivo biotério, ambos pertencentes à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

4.2 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais em biotério com condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12h cada (luzes artificiais, 7:00am - 7:00pm) e ciclo de exaustão de ar (15min/h), recebendo ração (Nuvilab from Nuvital Co) e água *ad libitum*.

4.3 PERÍODO BASAL E ACLIMATAÇÃO

Os 24 ratos com 15 semanas de vida foram subdivididos nos grupos abaixo descritos, e então mantidos em gaiolas metabólicas individuais, em condições controladas de umidade e temperatura, recebendo água e ração *ad libitum*, durante 10 dias (período basal) para ambientação e avaliação de parâmetros fisiológicos gerais (ingestão de água e ração, peso, diurese) e pressão arterial sistólica. Após esta 1ª etapa iniciou-se a experimentação com os tratamentos propostos, permanecendo assim durante 4 semanas.

4.4 GRUPOS

Vinte e quatro ratos SHRSP subdivididos em quatro grupos, suplementados por 4 semanas:

Grupo Controle (n=6);

Grupo Tratado Alfa-tocoferol (n=6);

Grupo L-NAME (n=6);

Grupo Tratado Alfa-tocoferol + L-NAME (n=6).

4.5 SUPLEMENTAÇÃO

Dentro deste período de experimentação os animais foram suplementados por gavagem oral, com a substância correspondente de cada grupo:

Grupo Controle: administração de 0,1ml de óleo de coco por rato, para mimetizar o estresse da gavagem oral;

Grupo Tratado Alfa-Tocoferol: 120 UI de alfa tocoferol (T-3376 Sigma[®], St. Louis, MO) diluído em 0,1 ml de óleo de coco;

Grupo L-NAME: administração de 0,1ml de óleo de coco por rato, para mimetizar o estresse da gavagem oral + 10mg/Kg/dia de L-NAME (N-5751 Sigma[®], St. Louis, MO) diluído no bebedouro dos animais;

Grupo Tratado Alfa-Tocoferol + L-NAME: 120 UI de alfa tocoferol diluído em 0,1 ml de óleo de coco + 10mg/Kg/dia de L-NAME diluído no bebedouro dos animais;

Durante os 28 dias também foram mensurados a ingestão de água e ração, peso, diurese e os níveis de pressão arterial sistólica.

4.6 L-NAME

Administrado diariamente na ordem de 10mg/Kg/dia diluído em água do bebedouro do animal, conforme protocolo estabelecido por Chillon e Baumbach (2004).

4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Análise dos parâmetros biológicos gerais

A partir do primeiro dia de período basal, os animais foram avaliados diariamente. Os parâmetros biológicos aferidos foram: peso corporal, diurese, ingestão de água e ração. Ainda foram observados, por ectoscopia, as condições do pêlo, pele e fâneros bem como o aspecto comportamental seguindo o protocolo estabelecido no LINDCD por Vianna (2008).

4.7.2 Pressão Arterial Sistólica

A pressão sistólica foi aferida através de pletismógrafo (Bio-oficina[®], Brasil), mensurada duas vezes na semana em dias alternados seguindo metodologia adotada por Vianna (1992) resumidamente descrita abaixo:

O animal teve a cauda introduzida no pletismógrafo, então a artéria caudal posicionada no mesmo, sofreu uma pressão externa, proporcionada pela água impulsionada no aparelho, que colabou suas paredes cessando o fluxo sanguíneo; ao promover a descompressão lentamente no manguito, a pressão sanguínea atingiu um nível suficiente para forçar um jato de sangue que registrou como pressão sistólica, e que foi lida na coluna líquida do aparelho que se modificou mediante a alteração de volume. A mensuração da pressão sanguínea foi feita em triplicata em cada rato, minimizando possíveis vieses. Após a medição utilizou-se a média simples para obtenção do resultado final da pressão arterial do animal avaliado. As aferições foram realizadas mantendo-se sempre o mesmo horário para evitar alterações decorrentes do ritmo circadiano.

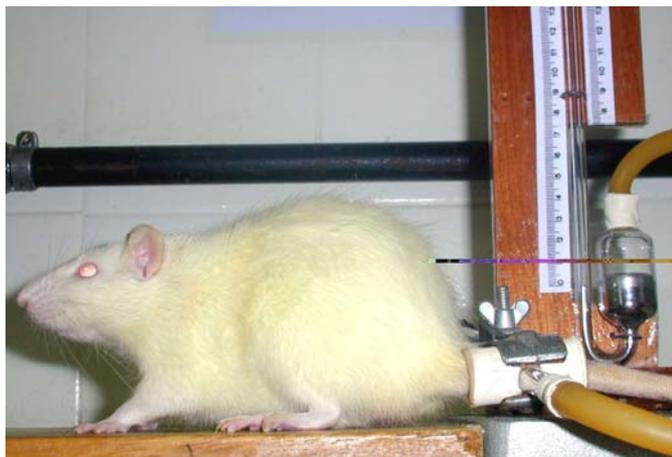


Figura 13: Aferição da pressão arterial por pletismografia

4.7.3 Testes Neurológicos

Os testes foram realizados diariamente e se basearam no teste de memória espacial (cognitivo), de equilíbrio e sensório-motor, todos seguindo protocolos já estabelecidos por Abou-Donia, Dechkovskaia e Goldstein (2002), Fujimoto, Longhi e Saatman (2004) e adotados no LINDCD (VIANNA, 2008). Os testes encontram-se descritos abaixo.

4.7.3.1 *Teste Cognitivo do Labirinto*

O teste cognitivo consistiu em testar a habilidade do rato em percorrer o trajeto de um labirinto, o qual cria a necessidade de armazenamento de memória, através de um mapa cognitivo (FUJIMOTO; LONGHI; SAATMAN, 2004). Antes dos testes os animais eram expostos a compostos fenólicos aromáticos, e este componente era agregado a ração do animal e colocado no final do labirinto, com a finalidade de estimular a exploração. A resposta ao teste foi aferida pela medição do tempo utilizado para completar todo o percurso (Figura 14). Os animais tinham 120 segundos para completar a tarefa.



Figura 14: Teste do Labirinto

4.7.3.2 Labirinto Aquático de Morris

O princípio aplicado é o mesmo do Teste cognitivo do Labirinto, visando a criação de uma memória espacial, contudo, neste teste os animais foram colocados em um tanque, com dimensões 90x50cm, preenchido com água e adicionada de uma substância miscível que promovia o turvamento da água e não permitia a visualização de uma plataforma de escape. Dentro do tanque, os ratos por extinto de sobrevivência deveriam nadar para encontrar a plataforma que estava localizada sempre no mesmo ponto. Depois de um treinamento prévio, antes do período basal, iniciou-se dentro do período experimental, o registro do tempo em que o animal encontrava a plataforma escondida.

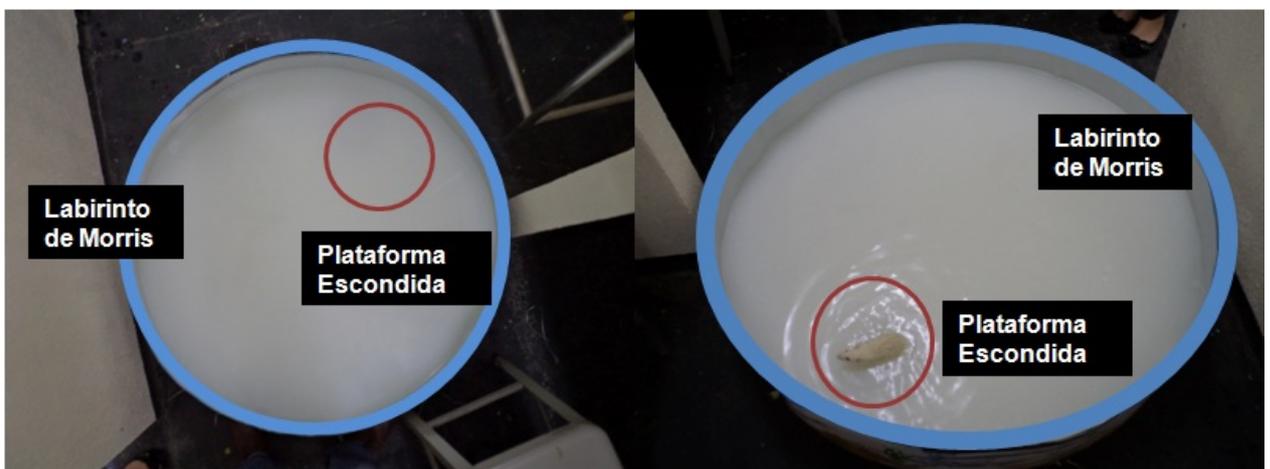


Figura 15: Teste do Labirinto Aquático de Morris

4.7.3.3 *Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta*

Os animais foram submetidos a um período de adaptação durante 05 dias, antes do período basal, que consistia em duas sessões diárias de treinamento onde os ratos eram colocados em uma caixa de plástico transparente, em um ambiente isolado de estímulos sonoros e visuais, e sem interferência do observador, para adaptação ao ambiente. Neste local, durante o período experimental, os animais eram expostos individualmente a 02 objetos de diferentes formatos, colocados em extremidades opostas, para livre exploração durante 10 minutos. Após 03 horas este procedimento era repetido. Em seqüência, após 180 minutos, um dos objetos era trocado por um novo objeto para checar a memória curta. O tempo em que o animal explorava tanto o objeto familiar quanto o objeto novo era registrado (MUMBY, 2005).

4.7.3.4 *Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa*

Para a checagem de preservação da memória longa, trocou-se o objeto novo apresentado no Teste de Memória Curta por outro objeto após 24 horas. Da mesma forma, que o teste de memória curta, foi avaliado quanto tempo o animal explorava o objeto novo e o objeto familiar (MUMBY, 2005).

Para ambos os testes (Memória Curta e Memória Longa), a exploração foi definida como o ato de cheirar ou tocar o objeto com as narinas ou as patas dianteiras.

Com vistas a evitar o viés olfatório provocado pelo odor de um rato transmitido para o objeto, captando desta forma a atenção do rato seguinte em experimentação, foi adotada uma medida preventiva: antes de iniciar sessão de testes com o próximo rato as peças eram higienizadas com água corrente, secas em papel toalha e depois borrifadas com álcool a 70° e novamente secas com papel toalha.



Figura 16: Teste de Memória Curta e Memória Longa

4.7.3.5 Teste Sensório-Motor de Alcance

Neste teste, o animal foi suspenso pela cauda e trazido próximo a borda da bancada. Animais com funções neurológicas normais estendem os membros anteriores quando trazidos ao alcance da bancada. Para a realização deste teste foram aplicados os escores: nota 1 - animal respondia apenas visualizando a bancada; nota 0,75 - quando requeria que as patas encostassem na bancada; nota 0,50 - quando requeria que o focinho encostasse na bancada; nota 0,25 - quando requeria um toque adicional do focinho à mesa; nota 0 - animal sem resposta.



Figura 17: Teste Sensório-Motor de Alcance

4.7.3.6 *Teste Motor de Reflexo Plantar*

O animal era suspenso pelo dorso cervical, e suas patas anteriores eram estimuladas por um pedaço fino de madeira, estimulando o fechamento da mesma sobre o pedaço de madeira. A escala usada foi: nota 1 - se o animal agarrasse a madeira e nota 0 - para ausência de reflexos.



Figura 18: Teste Motor de Reflexo Plantar

4.7.3.7 *Teste Motor de Reposicionamento Postural*

O animal era colocado com seu dorso na bancada e liberado da influência do manipulador. Se o animal recuperasse a postura recebia nota 1; caso o animal falhasse neste ato recebia a nota 0.

4.7.3.8 *Teste Motor de Reflexo de Queda-livre*

O animal era mantido a cerca de 20 cm acima de superfície macia e amortecedora, em posição dorsal e então era liberado. Quando o animal promovia o reposicionamento no ar e repousava sobre seus membros recebia a nota 1; caso o animal falhasse recebia a nota 0.

4.7.4 Exames Bioquímicos

4.7.4.1 *Marcador de estresse oxidativo*

Para realização da avaliação de estresse oxidativo no sangue animal foram dosados os níveis de malondialdeído, obtido a partir da centrifugação do sangue colhido em tubo descartável sem anticoagulante durante o sacrifício do animal. O sangue foi processado em centrífuga CELM modelo Kombat a 3500rpm por 15 minutos. O soro separado dos componentes celulares pela centrifugação e retirado do tubo primário por pipetagem com ponteiros descartáveis, sendo acondicionado em tubos secundários, identificados e estéreis. Foi usado o método colorimétrico para a dosagem de MDA, utilizando o equipamento Micronal B442, sendo a concentração de malondialdeído calculada pela absorção a 532nm e os resultados expressos em nmol.

4.7.4.2 *Lactato Desidrogenase Total (LDH)*

A amostra foi pipetada na cubeta, com reagente próprio, homogeneizada no porta-cubetas termostático a 37°C e ligado o cronômetro. Após 1 minuto, foi realizada a leitura da absorbância inicial. Novas leituras de absorbância foram executadas após exatamente 1, 2 e 3 minutos. As diferenças entre as absorbâncias foram similares, indicando a linearidade do método. Em seguida foi calculado o decréscimo de absorbância média por minuto (DA/minuto médio). O comprimento de onda utilizado foi de 340nm, sendo a fórmula utilizada para o cálculo LDH (U/L) = DA/minuto médio x fator. O fator 8095 foi utilizado calculado com base nas condições da reação cinética contínua.

4.7.4.3 *Fibrinogênio*

A determinação do fibrinogênio plasmático foi realizada pelo método descrito por Clauss (1957), utilizando o equipamento apropriado para turbidimetria. O sangue

extraído em tubos de ensaio com citrato de sódio a 3,2% (0,109M) foi centrifugado durante 15 minutos a 2500x g. Em seguida, realizadas diluições 1:5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:40 em tampão imidazol. Foram pré-aquecidas 0,2ml das amostras a 37°C durante 2 minutos, e acrescentado 0,1 ml de trombina reconstituída. Imediatamente, após a inclusão da trombina disparou-se o cronômetro e registrou-se os tempos de formação do coágulo. Foi calculado o tempo médio de coagulação para cada diluição, fazendo o teste em duplicata. Após esta primeira fase, foi construída a curva de calibração de fibrinogênio representando os tempos de coagulação em função da concentração de fibrinogênio. O valor de fibrinogênio de cada diluição da curva foi determinado multiplicando a concentração de fibrinogênio no plasma-referência pelo fator de diluição encontrada em tabela específica.

4.7.4.4 *Contagem de plaquetas*

O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante e a amostra diluída na solução Rees-Ecker na proporção de 1 / 200. Após esta etapa a solução foi agitada por 15 minutos e colocada em câmara de contagem no microscópio.

4.7.4.5 *Perfil lipídico*

Foram avaliados o colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos séricos através de ensaio enzimático. Para a análise do colesterol total o espectrofotômetro foi ajustado para realizar leitura de 500 a 550 nm de comprimento de onda e utilizada água destilada para estabelecer o zero de absorvância. Após realizar a padronização com soluções-padrão, 10 µl das amostras dos soros foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Após fazer a leitura de absorvância de uma amostra, foi respeitado o período de 30 segundos para realizar as leituras das outras amostras. O cálculo utilizado foi: $\text{Colesterol total} = (\text{Absorbância do Teste} / \text{Absorbância do Padrão}) \times \text{Fator de calibração}$.

Para a análise de HDL-colesterol foi pipetado em um tubo de ensaio 0,25 ml de soro e adicionado 0,25 ml de precipitante (ácido fosfotúngstico 1,50 mmol/l +

cloreto de magnésio 54 mmol/l). Em seguida a solução foi agitada vigorosamente em aparelho adequado, durante 30 segundos e deixada em repouso por 10 minutos na temperatura ambiente. Após esta fase, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm, homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Assim, foi determinada as absorbâncias do teste e do padrão no comprimento de ondas de 500 nm. O cálculo para determinação foi: Colesterol HDL (mg/dL) = (Absorbância do Teste/Absorbância do Padrão) x Fator de calibração.

Em relação aos triglicerídeos, a amostra foi adicionada de reagente apropriado e solução tampão (pH 7,0), e em seguida foi agitada lentamente até obter completa dissolução. Depois foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após a padronização e calibração, a leitura foi feita em espectrofotômetro ajustando o comprimento de onda entre 490-540nm. O cálculo para determinação foi: Triglicerídeos (mg/dL) = (Absorbância do Teste/Absorbância do Padrão) x Fator de calibração.

Em todos os testes enzimáticos, o fator de calibração foi calculado pela fórmula: Fator de calibração = Concentração do padrão (100mg/dl)/ absorbância do padrão.

Os níveis de LDL-colesterol foram calculados, de forma indireta, pela formula de Friedewald: LDL (mg/dl) = Col.Total - HDL - (Triglicerídeo/5).

4.8 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL

Ao final do período de suplementação nos dois experimentos os animais foram induzidos ao coma profundo, pela inalação de éter etílico e administração concomitante de tiopental sódico na dosagem de 25mg/kg de peso. Em seguida, foram fixados através das patas em posição dorsal. A via de acesso cirúrgico utilizada foi a cervico-esterno-laparotomia com ampla abertura das cavidades torácicas e abdominal para serem coletados aproximadamente 5 ml de sangue de cada rato. Posteriormente, foi perfundida solução salina (0,9% de NaCl), pelo ventrículo esquerdo para lavagem do encéfalo e realizada secção da aorta em sua porção abdominal, para extravasamento da solução salina e exsanguinação visando a eutanásia do animal.

Após a eutanásia, os animais foram colocados em posição ventral e realizado um corte horizontal profundo na porção dorso-cervical. Em seguida, uma abertura vertical foi promovida no sentido cérvico-nasal expondo a calota craniana, a mesma foi fragmentada para abrir o acesso ao encéfalo. Com uma pinça lisa o encéfalo foi alavancado e os nervos ligantes seccionados para completar a remoção.

4.8.1 Análise Histopatológica

Os encéfalos removidos foram incluídos em formaldeído a 10% para impregnação e posterior conservação. Em seguida, os encéfalos foram clivados e incluídos em parafina para processamento e preparo das lâminas para análise microscópica, sendo realizado corte de 5 micrometros de espessura, com o micrótomo Gung RM 2025 (Leica). As peças foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e a análise histopatológica para averiguação dos sinais de AVE na região hipocampal foi realizada utilizando microscópio óptico (Zeiss Axioplan, Zeiss, Alemanha), sob a ampliação de 10x, 40x, 60x, 100x, 200x,400x.

Em seguida foi procedida a contagem do número total de células do hipocampo e das sub-regiões CA1, CA2 e CA3. A quantificação por observação em microscópio óptico foi realizada em alta magnificação (400x), nas lâminas preparadas com corte transversal visualizando 40 campos por lâmina.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes neurológicos com avaliação por escores, foi utilizada a distribuição de frequência para análise dos resultados obtidos. Nos demais ensaios foi aplicado o teste ANOVA One-Way, complementado pelo teste de Tukey, para identificar significância estatística entre as médias. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo. O software utilizado foi o Graph Pad Prism[®] 5.0 versão para Windows[®] (Graph Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

Para avaliar a capacidade de reconhecimento de objetos novos e familiares, além da comparação estatística (ANOVA One-Way) entre grupos do tempo de

exploração, utilizou-se um índice que fornecia a razão de tempo de exploração e reconhecimento dos objetos novos. Essa razão designada de Índice de Discriminação (ID) foi determinada a partir da seguinte fórmula: Média de Tempo de Exploração do Objeto Novo / Somatório das Médias do Tempo total de exploração (*Média de Tempo de Exploração do Objeto Novo + Média de Tempo Exploração do Objeto Familiar*) x 100. Na interpretação destes resultados valores de ID maiores ou iguais a 50 representaram a capacidade de reconhecimento de objetos novos. Contudo, na análise comparativa entre grupos, maiores valores significaram melhor capacidade de distinção e reconhecimento de objetos.

5 RESULTADOS

5.1 TESTES NEUROLÓGICOS

5.1.1 Testes Sensório-Motores

As análises dos resultados dos testes neurológicos demonstraram que a partir da 2ª semana os ratos do grupo L-NAME apresentaram, no Teste de Reflexo Plantar, o escore 0, representando falha no cumprimento da tarefa. Na terceira semana, os grupos Controle, L-NAME e Alfa-tocoferol+L-NAME apresentaram aumento da frequência no aparecimento do escore 0 e estes resultados se repetiram no grupo L-NAME na 4ª semana. No entanto, nesta última semana os grupos Alfa-Tocoferol + L-NAME e Controle tiveram um aumento na incidência do escore 1 (Tabela 1).

Os grupos L-NAME e Alfa-tocoferol+L-NAME também demonstraram um aumento na incidência do escore 0 no Teste Motor de Reposicionamento Postural e Teste Motor de Queda-Livre, durante a 3ª semana, indicando o não-cumprimento da tarefa, característica que pode ser conferida a ação deletéria do L-NAME. Entretanto, apesar do aparecimento do escore 0 no grupo Alfa-tocoferol+L-NAME, a incidência é claramente mais elevada no Grupo L-NAME e esta diferença ficou evidente na quarta semana, quando o grupo Alfa-tocoferol+L-NAME recuperou a porcentagem do escore 1.

Ainda na tabela 1, o Teste Sensório-Motor de Alcance apresentou, a partir da 3ª semana, um resultado desfavorável para o grupo Alfa-tocoferol + L-NAME quando ocorreu o aparecimento do escore 0 e conseqüente redução da incidência do escore 1. Contudo, o grupo L-NAME, nesta mesma semana, apresentou um aumento do escore 0,5 indicando que o grupo não cumpriu integralmente a tarefa durante este período. Na 4ª semana, o grupo L-NAME apresentou a diminuição da incidência do escore 1, enquanto o grupo Alfa-tocoferol + L-NAME aumentou a frequência do aparecimento deste escore. Adicionalmente, o grupo Alfa-tocoferol não apresentou alteração no cumprimento dos testes neurológicos sensório-motores.

Tabela 1: Representa a distribuição de frequência dos escores na comparação entre grupos no Teste Sensório-Motor de Alcance, Teste Motor de Reflexo Plantar, Teste Motor de Reposicionamento Postural e Teste Motor de Queda-Livre (n=24)

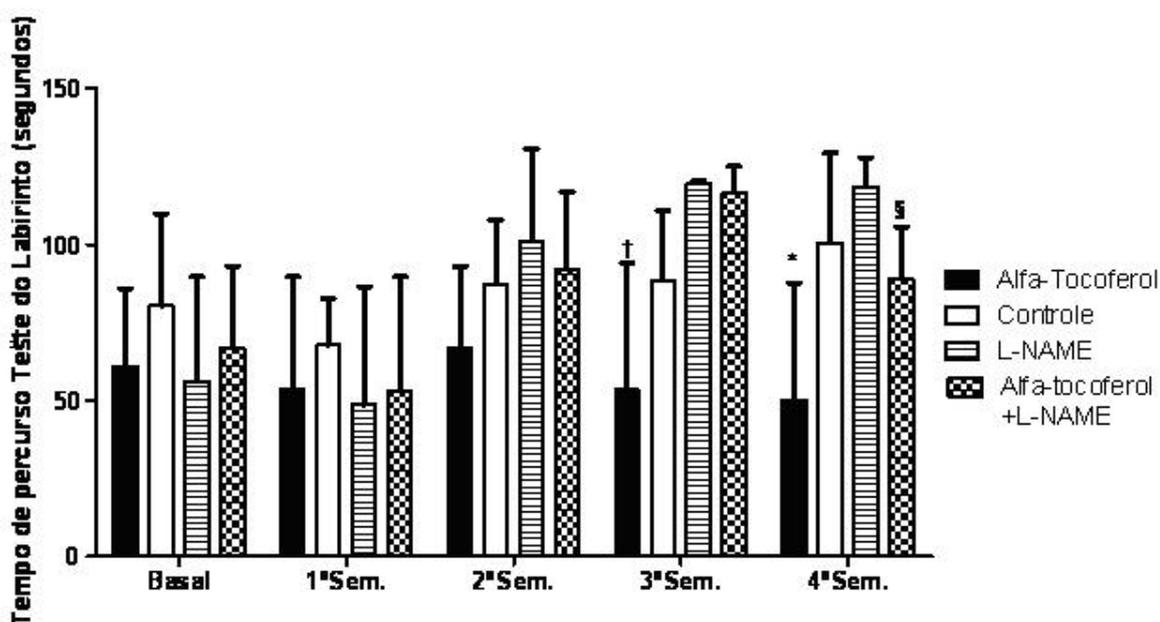
Teste	Período Basal Score					1ª Semana Score					2ª Semana Score					3ª Semana Score					4ª Semana Score				
T SMA (%)	0	0,25	0,5	0,75	1	0	0,25	0,5	0,75	1	0	0,25	0,5	0,75	1	0	0,25	0,5	0,75	1	0	0,25	0,5	0,75	1
AT	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
Controle	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
L-NAME	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	5,6	0	94,4	12,5	0	6,25	0	81,3
AT +L-NAME	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	11,1	0	0	0	88,89	7,7	0	0	0	92,3
TM RP (%)	0	1				0	1				0	1				0	1				0	1			
AT	0	100				0	100				0	100				0	100				0	100			
Controle	0	100				0	100				0	100				13,4	86,6				11,11	88,89			
L-NAME	0	100				0	100				20	80				66,6	33,4				61,54	38,46			
AT + L-NAME	0	100				0	100				0	100				16,67	83,33				6,25	93,75			
T MP (%)	0	1				0	1				0	1				0	1				0	1			
AT	0	100				0	100				0	100				0	100				0	100			
Controle	0	100				0	100				0	100				0	100				0	100			
L-NAME	6,7	93,3				0	100				0	100				13,4	86,6				23,07	76,93			
AT + L-NAME	0	100				0	100				0	100				11,11	88,89				0	100			
TM QL (%)	0	1				0	1				0	1				0	1				0	1			
AT	0	100				0	100				0	100				0	100				0	100			
Controle	0	100				0	100				0	100				0	100				0	100			
L-NAME	6,7	93,3				0	100				0	100				13,4	86,6				23,07	76,93			
AT + L-NAME	0	100				0	100				0	100				11,11	88,89				0	100			

Legenda:

T SMA: Teste Sensório-Motor de Alcance
 TM RP: Teste Motor de Reflexo Plantar
 TM P: Teste Motor de Reposicionamento Postural
 TM QL: Teste Motor de Queda-Livre

5.1.2 Testes Neurológicos Cognitivos - Memória Espacial

No que se refere aos padrões de manutenção ou prejuízo da função da memória, o teste de labirinto apresentou uma redução significativa do tempo de execução da tarefa a partir da 3ª semana no grupo alfa-tocoferol quando comparado aos grupos L-NAME e Alfa-tocoferol + L-NAME, indicando consolidação da memória espacial. Na 4ª semana foi encontrada diferença significativa com relação ao grupo Controle e houve a manutenção desta diferença somente em relação ao grupo L-NAME. Nesta semana ainda foi encontrada a redução significativa no tempo de cumprimento da tarefa pelo grupo Alfa-tocoferol + L-NAME em comparação ao grupo L-NAME (Figura 19) (Valores no ANEXO A - Tabela 6).



† $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME e ao Grupo AT+L-NAME

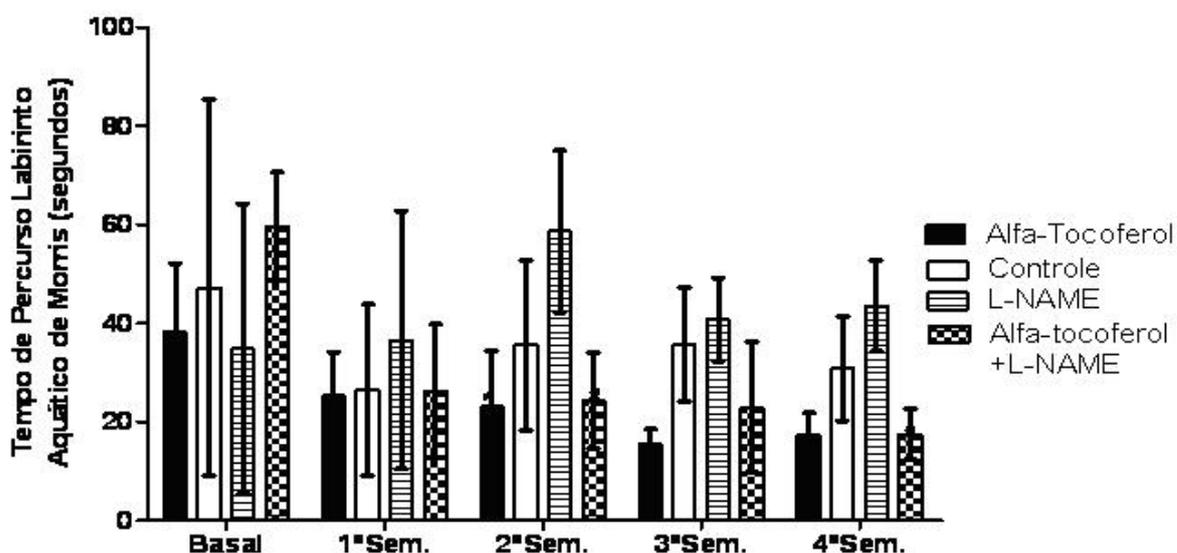
* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle e ao Grupo L-NAME

§ $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

Figura 19: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto (n=24)

Os resultados referentes ao Labirinto Aquático de Morris confirmaram os resultados de preservação de memória do Teste do Labirinto. A partir da 2ª semana, os grupos Alfa-tocoferol e Alfa-tocoferol + L-NAME apresentaram diferença significativa no tempo de cumprimento da tarefa quando comparados ao grupo L-NAME. O alfa-tocoferol também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em

comparação ao grupo Controle e esta diferença se manteve até o final do experimento (Valores no ANEXO A - Tabela 7).



* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle e ao Grupo L-NAME
 # $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

Figura 20: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto Aquático de Morris (n=24)

5.1.3 Testes Neurológicos Cognitivos - Memória de Reconhecimento

Na avaliação da memória curta, os grupos Alfa-tocoferol e Alfa-tocoferol +L-NAME na 2ª semana apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo Controle. O grupo Alfa-tocoferol+L-NAME ainda demonstrou diferença significativa com o grupo L-NAME. Interessantemente, dentro do grupo Alfa-tocoferol, ao comparar a média de tempo que os animais gastaram com o objeto novo com a média de tempo gasto com o objeto velho foi encontrado aumento significativo deste tempo. Na 3ª e 4ª semana, este último resultado se repetiu e o grupo Alfa-tocoferol ainda apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) do tempo de exploração do objeto novo em comparação com o grupo L-NAME.

Surpreendentemente, o grupo Alfa-tocoferol+L-NAME também apresentou na 3ª e 4ª semana diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo L-NAME e ao comparar a média de tempo que os animais gastaram com o objeto novo com a

média de tempo gasto com o objeto velho foi encontrado aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo (Tabela 2).

Tabela 2: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta (n=24)

Teste Mem. Curta	Basal		1ª Sem.		2ª Sem.		3ª Sem.		4ª Sem.	
	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF
Alfa-tocoferol	16,67 \pm 4,73	11,13 \pm 2,80	7,97 \pm 5,23	3,07 \pm 1,01	10,67 \pm 1,53* ϵ^{α}	3,20 \pm 1,11	17,33 \pm 3,85* ϵ^{α}	5 \pm 1,73	13,67 \pm 1,53 ϵ^{α}	5,87 \pm 1,63
Controle	17,33 \pm 4,73	12,33 \pm 1,53	7,67 \pm 7,23	6,33 \pm 6,66	5 \pm 1,73	3,67 \pm 0,65	6,67 \pm 1,15	5,30 \pm 1,85	7,33 \pm 5,77	4,67 \pm 1,14
L-NAME	15 \pm 6,04	12,60 \pm 4,72	3,25 \pm 1,89	2,93 \pm 0,38	6,33 \pm 1,53	6,47 \pm 1,56	5,75 \pm 1,5	4,60 \pm 1,06	3 \pm 1,83	3,10 \pm 1,32
AT+L-NAME	17 \pm 7,96	12,5 \pm 2,89	6,75 \pm 2,06	5,03 \pm 2,94	12 \pm 5,29* ϵ	9,26 \pm 6,26	12 \pm 3,74 ϵ^{β}	5,83 \pm 1,04	7,67 \pm 1,53 ϵ^{β}	2,77 \pm 0,68

Legenda:

TGON: Tempo gasto com o objeto novo / TGOF Tempo gasto com o objeto familiar

*p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle no parâmetro TGON

ϵ p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME no parâmetro TGON

α p<0,05 considerado significativo quando comparado TGON com TGOF do Grupo Alfa-tocoferol

β p<0,05 considerado significativo quando comparado TGON com TGOF do Grupo AT+L-NAME

O índice de discriminação referente à memória curta (Figura 21) demonstrou, um aumento da capacidade da distinção entre objetos familiares e novos dos grupos tratados com alfa-tocoferol. Em contraste, pode-se observar que o grupo L-NAME é o único que aparece abaixo da linha de corte (Índice 50), refletindo dificuldade no armazenamento da memória e reconhecimento das formas exploradas.

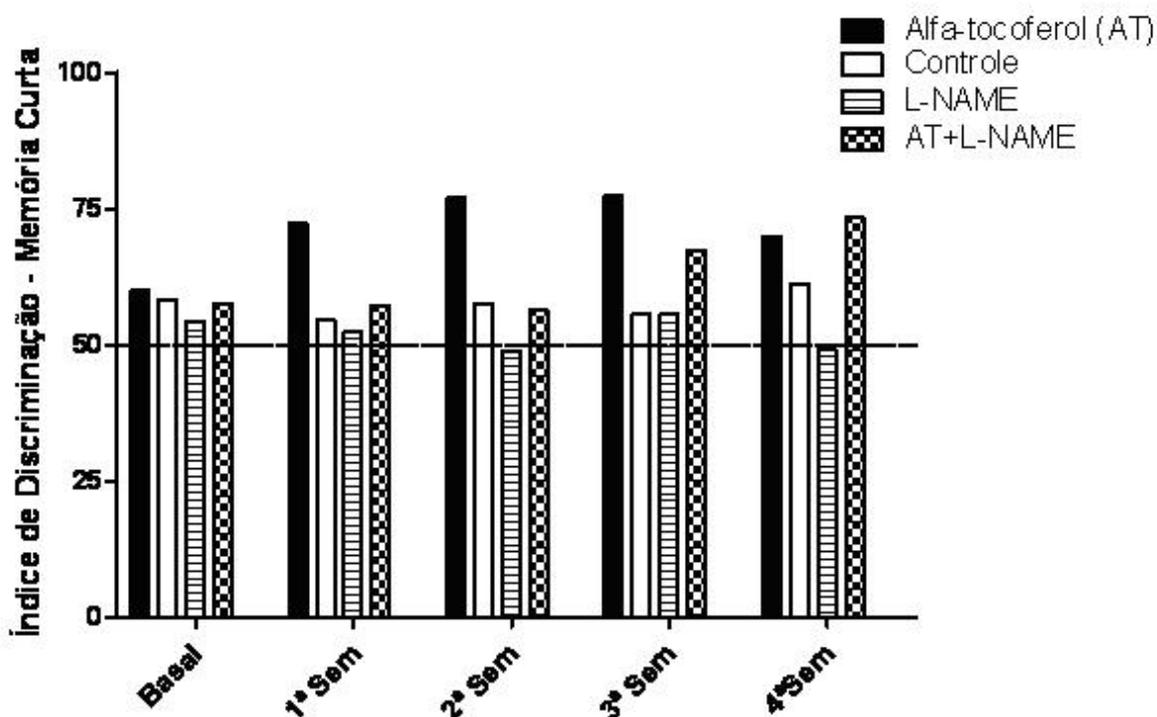


Figura 21: Representa o índice de discriminação do Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Curta (n=24)

Nos resultados referentes à consolidação da memória, os animais do grupo Alfa-tocoferol apresentaram, na 3ª e 4ª semana, valores maiores de exploração dos objetos novos em relação aos grupos Controle e L-NAME. Da mesma forma, o grupo Alfa-tocoferol+L-NAME apresentou nesta tese, durante a 4ª semana, os mesmos resultados do grupo Alfa-tocoferol. Em adição, na comparação entre os tempos de exploração de objetos velhos e novos o grupo Alfa-tocoferol apresentou essa capacidade de distinção desde a 1ª semana, já o grupo Alfa-tocoferol+L-NAME indicou distinção no reconhecimento de formas familiares e novas a partir da 2ª semana. Estes resultados de memória espacial e reconhecimento de objetos

parecem indicar que o alfa-tocoferol possui importante papel na preservação da memória (Tabela 3).

Tabela 3: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa (n=24)

Teste Mem. Curta	Basal		1ª Sem.		2ª Sem.		3ª Sem.		4ª Sem.	
	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF	TGON	TGOF
AT	13,81 \pm 7,68	10,10 \pm 1,01	11,67 \pm 4,9 ^{α}	6,5 \pm 1,32	10,67 \pm 1,53 ^{α}	5,27 \pm 0,87	13,33 \pm 1,15* ^{α}	6,60 \pm 1,05	12 \pm 4,36* ^{α}	5,57 \pm 1,69
Controle	14,42 \pm 11,35	10,47 \pm 6,12	7,00 \pm 7,81	6,33 \pm 4,93	6,33 \pm 3,06	5,63 \pm 3,35	6,00 \pm 4,36	4,57 \pm 3,93	4,67 \pm 1,53	3,90 \pm 1,35
L-NAME	10,32 \pm 5,2	9,61 \pm 4,63	8 \pm 5,42	7,5 \pm 4,43	6,5 \pm 3,11	5,38 \pm 3,47	5 \pm 3,16	6,50 \pm 3,11	2,5 \pm 0,58	2,55 \pm 1,46
AT+L-NAME	17,9 \pm 8,93	13,83 \pm 4,95	8,25 \pm 3,77	6,35 \pm 1,73	9 \pm 4,97 ^{β}	3,23 \pm 1,42	10,75 \pm 4,86 ^{β}	3,48 \pm 1,80	9 \pm 1,15* ^{β}	4,13 \pm 0,83

Legenda:

TGON: Tempo gasto com o objeto novo / TGOF Tempo gasto com o objeto familiar

*p<0,05 considerado significativo quando comparado aos Grupos L-NAME e Controle no parâmetro TGON

^{α} p<0,05 considerado significativo quando comparado TGON com TGOF do Grupo AT

^{β} p<0,05 considerado significativo quando comparado TGON com TGOF do Grupo AT+L-NAME

Reafirmando os resultados encontrados na tabela acima, o índice de discriminação na memória longa, corroborou com os outros resultados dos testes de memória (Figura 22). Neste teste, ficou claro que os baixos níveis do índice foram encontrados em animais tratados com L-NAME. Contudo, o grupo controle também apresentou valores do índice próximo ao limite da linha de corte (Índice 50). Em ambos os grupos tratados com alfa-tocoferol os índices foram maiores, refletindo maior capacidade de consolidação da memória.

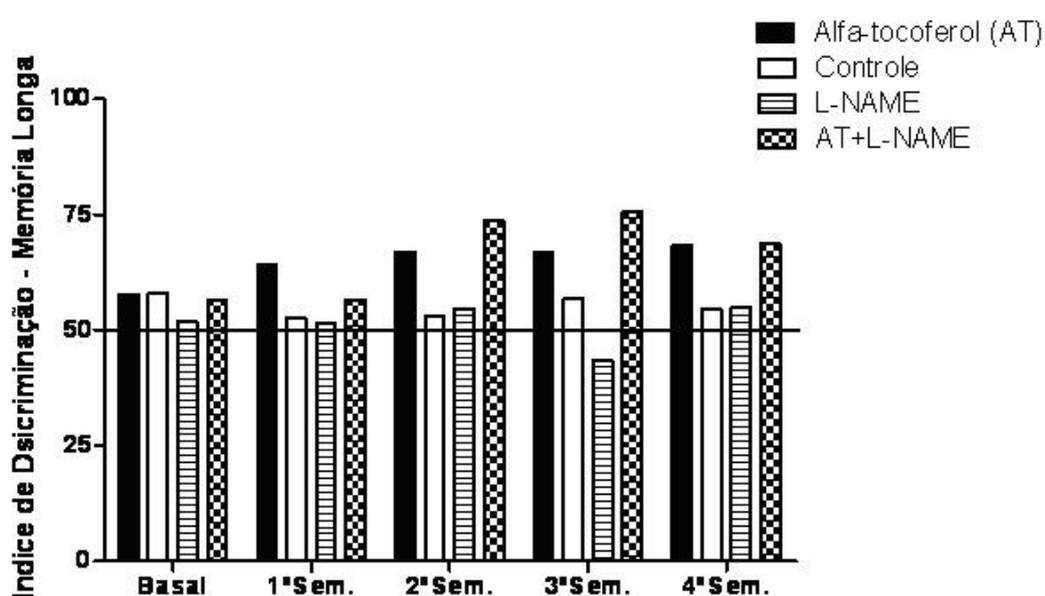


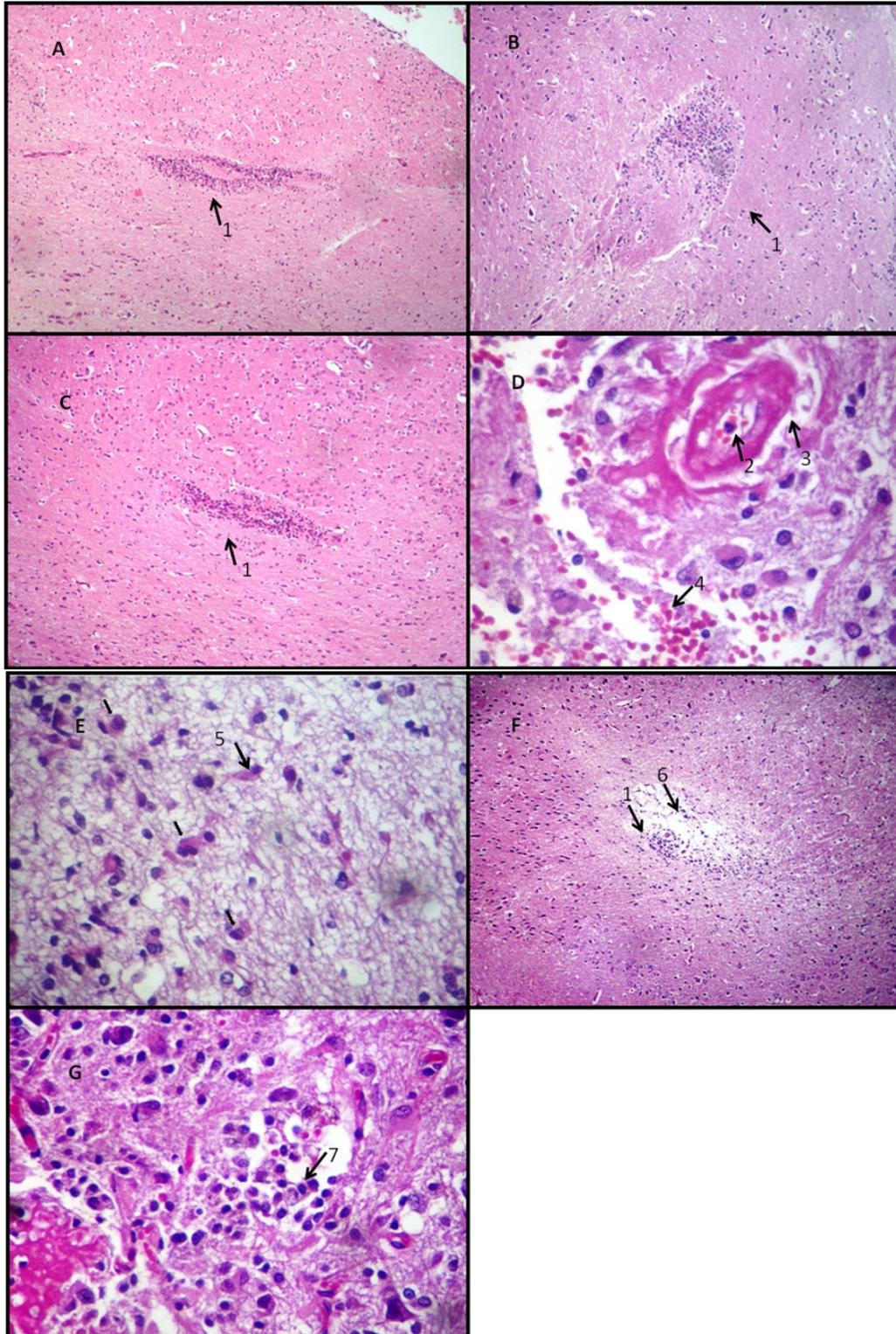
Figura 22: Representa o índice de discriminação do Teste de Reconhecimento do Objeto Novo - Memória Longa (n=24)

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5.2.1 Análise Histopatológica - Lesão Tecidual

Na análise histopatológica da região hipocampal, o Alfa-tocoferol apresentou resultados contundentes de preservação tecidual. Contudo, devido aos níveis elevados de pressão arterial fenotípicos da linhagem SHRSP foram observados em todos os grupos a presença de nódulos gliais. Contudo, o grupo L-NAME teve maior

visualização de características referentes à lesão cerebral promovidas pelo AVE. Foram observadas neste grupo vacuolização e degeneração do neurópilo, degeneração fibrinóide perivascular, extravasamento de hemácias, infiltrado inflamatório e astrócitos reativos (Figura 23). Tais alterações vistas neste grupo não foram visualizadas no grupo com administração concomitante de Alfa-tocoferol e L-NAME.

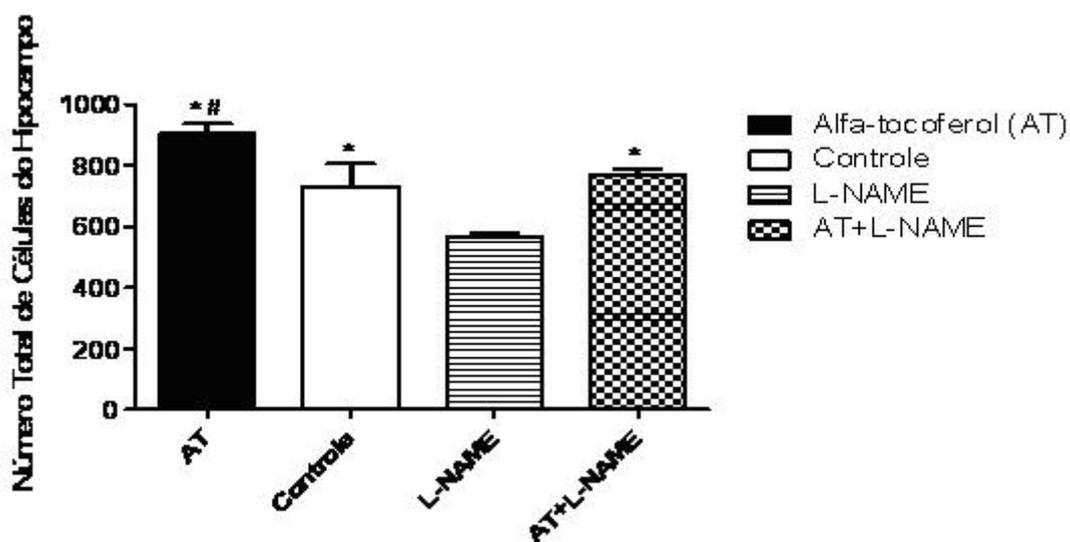


Legenda: A - Grupo Alfa-Tocoferol; B- Grupo Alfa-Tocoferol + L-NAME; C - Grupo Controle; D,E,F,G - Grupo L-NAME. Alterações histopatológicas: 1-Nódulo Glial; 2- Neutrófilo na luz vascular; 3- Degeneração fibrinóide perivascular; 4- Extravasamento de hemácias; 5- Astrócitos ativados; 6- Vacuolização e degeneração do neuropilo; 7- Infiltrado inflamatório (células mononucleares). (HE/ Aumento em Escala Centesimal).

Figura 23: Corte transversal do hipocampo dos grupos estudados com indicação das alterações histopatológicas

5.2.2 Contagem de Células Hipocampais

Esta tendência neuroprotetora do alfa-tocoferol parece ter sido estendida na manutenção e proliferação das células hipocampais, confirmando os resultados dos testes de memória. Interessantemente, os grupos tratados com alfa-tocoferol apresentaram resultados benéficos na contagem do número total de células do hipocampo (Figura 24). O grupo Alfa-tocoferol ($905 \pm 77,27$ células por campo) apresentou contagem significativa superior de células em relação ao grupo Controle ($770,67 \pm 44,80$ células por campo), e ao grupo L-NAME ($567,67 \pm 26,58$ células por campo). Entretanto, em comparação ao grupo Alfa-tocoferol+L-NAME ($732 \pm 178,84$ células por campo) não houve diferença significativa. O grupo Alfa-tocoferol + L-NAME também apresentou contagem de células significativamente maiores que o grupo L-NAME (Valores no ANEXO A - Tabela 8).

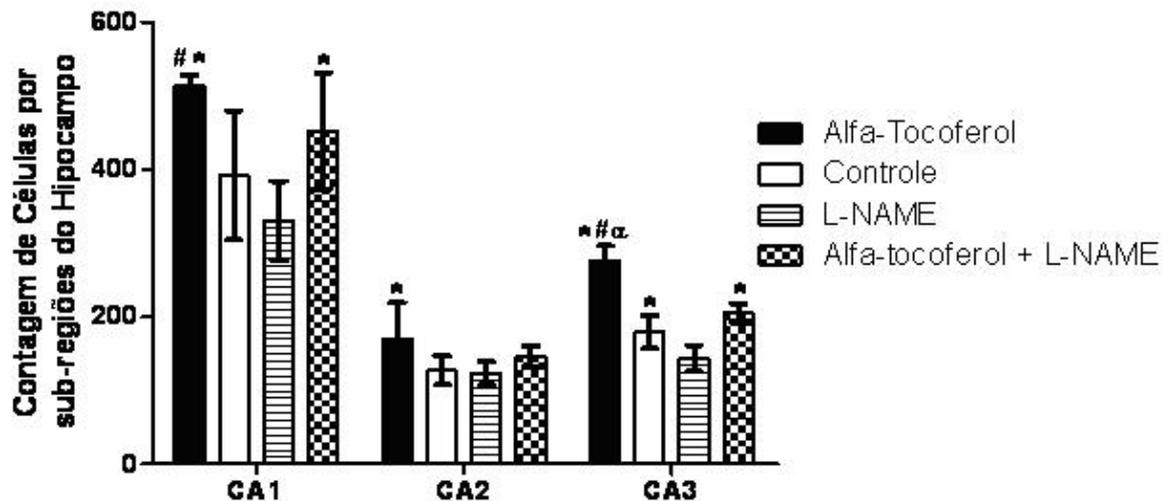


* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

$p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle

Figura 24: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação à contagem do número total de células do hipocampo ($n=24$)

As sub-regiões do hipocampo confirmaram a diferença exposta com destaque para as áreas CA1 e CA3 (Figura 25).



*p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

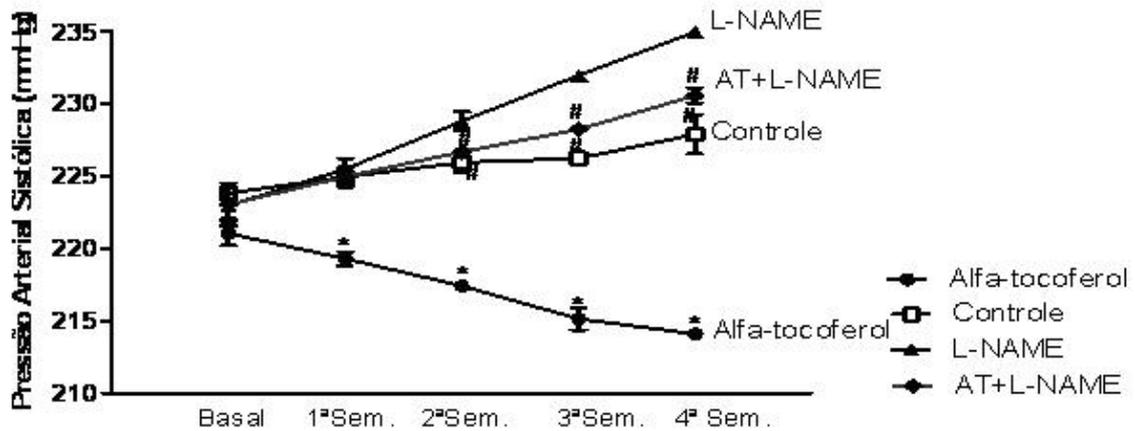
#p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle

αp<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Alfa-tocoferol+L-NAME

Figura 25: Representa a média ± DP na comparação entre grupos na contagem de células das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo (n=24)

5.3 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Em relação aos parâmetros referentes a pressão arterial sistólica pressóricos, a inibição da óxido nítrico sintase endotelial pela administração crônica do L-NAME aumentou significativamente a pressão arterial sistólica do Grupo L-NAME alcançando $234,93 \pm 0,36$ mmHg na 4ª semana. Nesta mesma semana o grupo Alfa-tocoferol + L-NAME apresentou níveis de $230,57 \pm 1,27$ mmHg e os grupos Alfa-tocoferol e Controle registraram $214,09 \pm 0,32$ mmHg e $227,89 \pm 3,32$ mmHg, respectivamente. Adicionalmente, o Grupo Alfa-Tocoferol apresentou redução significativa nos níveis de pressão arterial sistólica em comparação aos outros grupos logo na 1ª semana de tratamento, e os grupos Alfa-tocoferol+L-NAME e Controle, a partir da 2ª semana diferiram significativamente ($p < 0,05$) do grupo L-NAME (Figura 26).

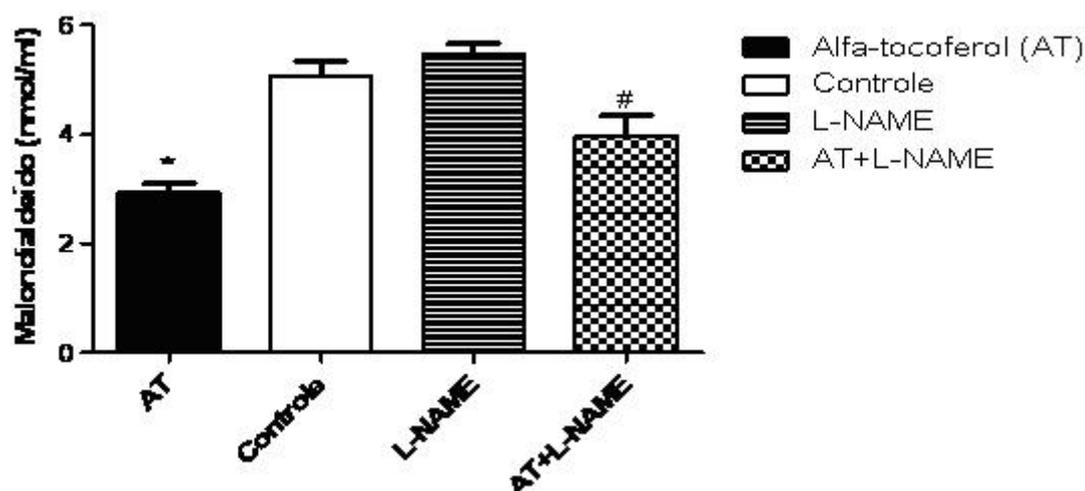


* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado aos Grupos Controle, L-NAME e AT+L-NAME
 # $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

Figura 26: Comparação de média \pm DP entre grupos nos níveis da pressão arterial sistólica (n=24)

5.4 ESTRESSE OXIDATIVO

No que se refere ao estresse oxidativo, a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico revelou que os níveis de malondialdeído foram significativamente ($p < 0,05$) menores nos ratos do grupo Alfa-Tocoferol ($2,93 \pm 0,43 \text{ nmol}$) em comparação com os animais do grupo Controle ($5,08 \pm 0,64 \text{ nmol}$), grupo L-NAME ($5,48 \pm 0,44$) e grupo Alfa-tocoferol + L-NAME ($3,98 \pm 0,90$). O grupo Alfa-tocoferol + L-NAME também apresentou valores reduzidos quando comparados aos grupos Controle e L-NAME (Figura 27).



* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado com os Grupos Controle, L-NAME e AT+L-NAME

$p < 0,05$ considerado significativo quando comparado com os Grupos Controle e L-NAME

Figura 27: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de malondialdeído (n=24)

5.5 PERFIL LIPÍDICO

Em relação ao perfil lipídico, o colesterol total do grupo alfa-tocoferol foi significativamente menor do que os dos grupos Controle e Alfa-tocoferol + L-NAME. O LDL-colesterol também apresentou níveis muito reduzidos no grupo Alfa-Tocoferol em comparação com todos os outros grupos. Porém, na análise do HDL-colesterol tanto o grupo Alfa-Tocoferol quanto o grupo Alfa-tocoferol + L-NAME apresentaram níveis significativamente elevados em comparação ao grupo Controle. Por sua vez, os níveis de triglicérideo sérico, apresentaram-se significativamente reduzidos apenas no grupo Alfa-Tocoferol (Tabela 4).

Tabela 4: Representa a média \pm DP do perfil lipídico de ratos SHRSP tratados e controle (n=24), após 4 semanas de tratamento

Parâmetro	Alfa-tocoferol	Controle	L-NAME	AT+L-NAME
Colesterol total (mg/dl)	60,5 \pm 4,80*	74,5 \pm 1,29	78,44 \pm 1,5	65,35 \pm 0,49
LDL (mg/dl)	11,95 \pm 1,10 ^a	37,5 \pm 3,54	35,24 \pm 12,52	28,08 \pm 13,36
HDL (mg/dl)	40,25 \pm 4,92 ^y	27 \pm 3,07	31,20 \pm 6,79	37,6 \pm 6,22 ^y
Triglicerídeo (mg/dl)	43,5 \pm 12,45 ^ô	50 \pm 12,63	60,62 \pm 2,88	48,35 \pm 11,77

* p<0,05 considerado significativo quando comparado aos Grupos Controle, AT+L-NAME e L-NAME

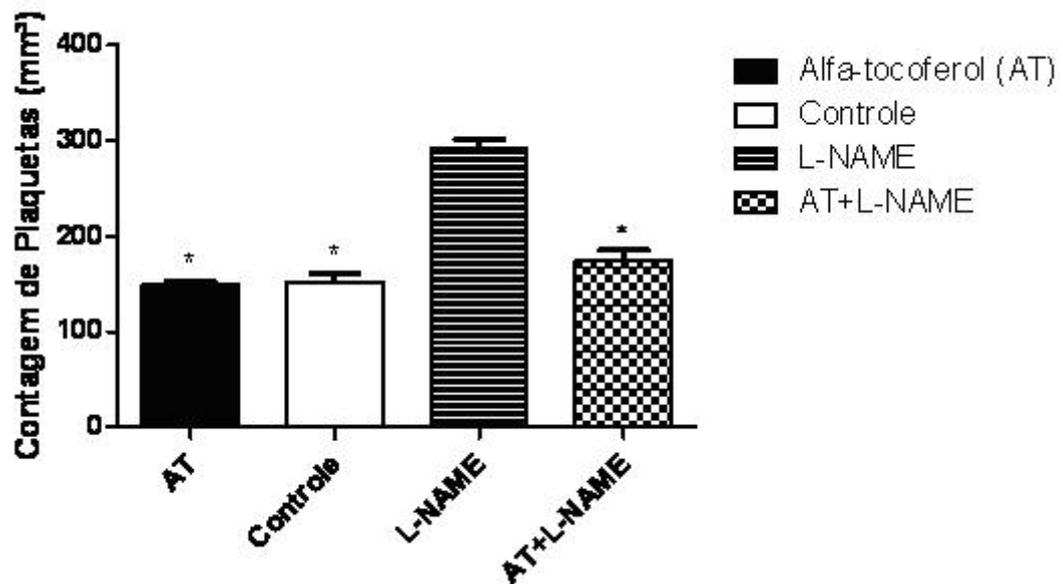
^a p<0,05 considerado significativo quando comparado aos Grupos Controle, L-NAME e AT+L-NAME

^y p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupos Controle

^ô p<0,05 considerado significativo quando comparado aos Grupos L-NAME

5.6 PARÂMETROS COAGULATÓRIOS

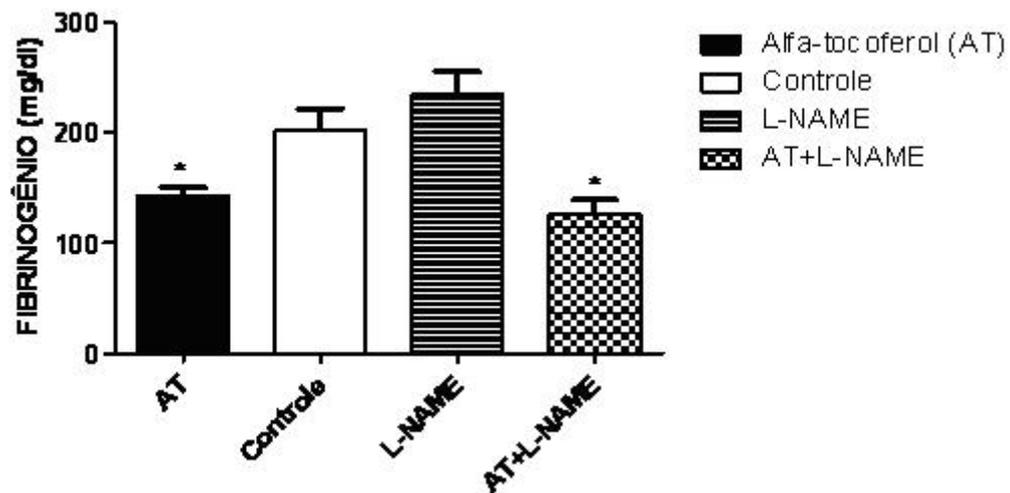
Na avaliação dos parâmetros coagulatórios, a contagem de plaquetas do grupo L-NAME apresentou valor quantitativo significativamente maior em comparação aos outros grupos. Os ratos do grupo Alfa-Tocoferol foram os que apresentaram os menores valores (148,4 \pm 10,97mm³), no entanto, apenas significativo em comparação com o grupo L-NAME (292,67 \pm 21,55mm³). Não houve diferença significativa entre os grupos Alfa-Tocoferol, Alfa-Tocoferol+L-NAME (174,20 \pm 26,53mm³) e Controle (152,5 \pm 19,36mm³), porém estes dois últimos grupos também diferiram significativamente (p<0,05) do grupo L-NAME (Figura 28).



* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado com o Grupo L-NAME

Figura 28: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação à contagem de plaquetas (n=24)

Corroborando com os efeitos benéficos da suplementação do alfa-tocoferol nos parâmetros coagulatórios, as interpretações dos resultados nos níveis de fibrinogênio apresentaram similaridade com os resultados da contagem de plaquetas. Os grupos Alfa-Tocoferol ($137 \pm 26,59 \text{mg/dl}$), Alfa-tocoferol + L-NAME ($125,50 \pm 33,25 \text{mg/dl}$) e Controle ($154,25 \pm 20,63 \text{mg/dl}$) também apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) menores quando comparados aos grupos L-NAME ($235 \pm 49,50 \text{mg/dl}$). Igualmente, não houve diferença significativa entre os grupos Alfa-Tocoferol+L-NAME, Controle e Alfa-Tocoferol (Figura 29).

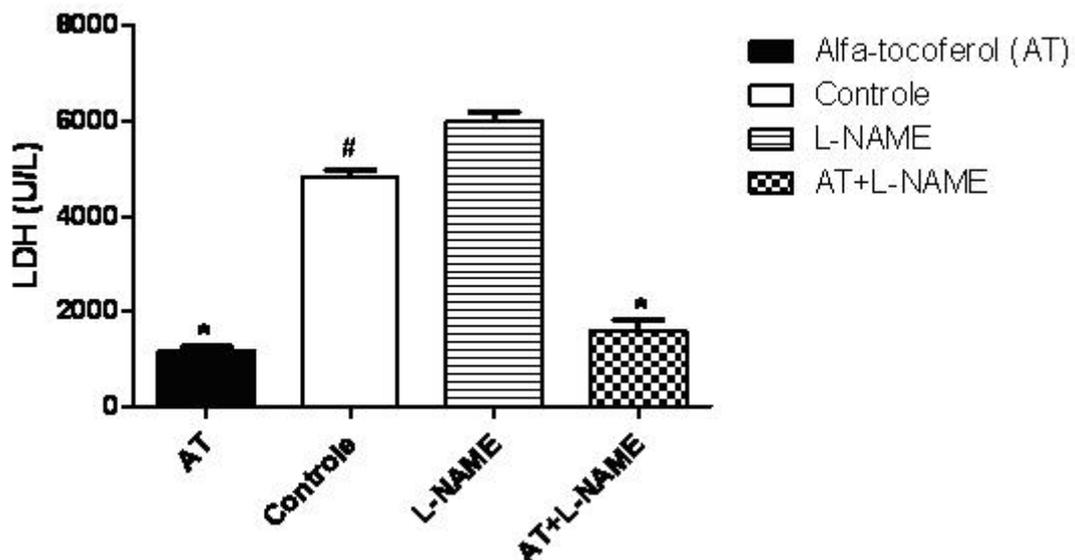


* $p < 0,05$ considerado significativo quando comparado aos Grupos L-NAME e Controle

Figura 29: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de fibrinogênio (n=24)

5.7 MARCADOR DE INFLAMAÇÃO

Os níveis de lactato desidrogenase, apresentaram-se demasiadamente elevados no grupo L-NAME ($6010 \pm 409,09 \text{ U/L}$). Assim, os níveis de LDH dos grupos Alfa-Tocoferol ($1173,6 \pm 200,09 \text{ U/L}$), Alfa-Tocoferol + L-NAME ($1599 \pm 588,97 \text{ U/L}$) e Controle ($2187,5 \pm 973,29 \text{ U/L}$) foram significativamente menores em relação aos do grupo L-NAME. Ainda houve diferença significativa dos grupos Alfa-tocoferol e Alfa-tocoferol + L-NAME em relação ao grupo Controle. Novamente, não houve diferença significativa entre os grupos Alfa-Tocoferol+L-NAME e Alfa-Tocoferol (Figura 30).



#p<0,05 considerado significativo quando comparado com o Grupo L-NAME

*p<0,05 considerado significativo quando comparado com os Grupos Controle e L-NAME

Figura 30: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos em relação aos níveis de LDH (n=24)

5.8 PARÂMETROS BIOLÓGICOS

Todos os animais do experimento apresentaram oscilação no peso corpóreo durante as 4 semanas de tratamento, no entanto, sem apresentar significância estatística. A avaliação dos parâmetros diurese, ingestão de água e ração também não identificou alterações significativas entre os grupos em nenhuma das semanas dos experimentos (Tabela 5). No quesito aspecto físico, os animais do grupo L-NAME apresentaram-se apáticos, irritáveis ao toque do manipulador, eriçamento da pelagem e dois animais apresentaram irreversível ataxia e hemiparesia na 3ª semana até o final do experimento.

Tabela 5: Representa a média \pm DP do peso corporal, diurese e ingestão de água e ração de ratos SHRSP tratados e controles (n=24)

Parâmetros	Grupos	Período Basal	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
Peso Corporal (g)	AT	200 \pm 9,74	203 \pm 14,56	215,69 \pm 13,56	220,76 \pm 11,27	215,67 \pm 11,56
	Controle	197,33 \pm 13,74	201,23 \pm 16,83	210,87 \pm 7,84	218 \pm 10,55	216,97 \pm 9,86
	L-NAME	194,69 \pm 12,23	218,60 \pm 18,43	229,50 \pm 18,50	224,45 \pm 10,67	211,95 \pm 13,48
	AT + L-NAME	214,83 \pm 12,71	201 \pm 11,37	212,76 \pm 15,06	216,79 \pm 15,96	212,88 \pm 11,93
Diurese (ml)	AT	7,56 \pm 2,03	5,26 \pm 3,03	5,38 \pm 2,03	6,23 \pm 1,55	6,87 \pm 0,92
	Controle	6,87 \pm 3,43	5,63 \pm 2,03	6,54 \pm 2,33	6,45 \pm 2,33	7,83 \pm 1,23
	L-NAME	6,23 \pm 0,83	5,36 \pm 1,57	6,11 \pm 0,83	7,93 \pm 3,15	6,77 \pm 2,16
	AT + L-NAME	6,79 \pm 2,15	6,83 \pm 1,95	6,92 \pm 1,95	6,62 \pm 0,70	6,26 \pm 0,80
Ingestão de ração (g)	AT	14 \pm 1,46	17,45 \pm 1,21	15,88 \pm 1,60	16,95 \pm 3,05	13,48 \pm 3,81
	Controle	14,56 \pm 2,32	15,47 \pm 1,34	15,99 \pm 0,87	13,57 \pm 2,07	14,56 \pm 3,36
	L-NAME	14,71 \pm 2,15	16,76 \pm 2,80	12,97 \pm 2,90	12,10 \pm 3,45	10,02 \pm 1,76
	AT + L-NAME	15,57 \pm 2,98	17,29 \pm 2,35	14,98 \pm 1,43	13,94 \pm 1,98	12,71 \pm 2,54
Ingestão de água (ml)	AT	47,74 \pm 8,87	46,95 \pm 6,78	40,31 \pm 7,43	37,69 \pm 5,41	34,19 \pm 6,12
	Controle	45,98 \pm 3,46	49,69 \pm 4,76	37 \pm 6,68	32,68 \pm 3,23	38,67 \pm 5,78
	L-NAME	42,74 \pm 4,75	35,95 \pm 2,10	39,57 \pm 1,75	33,12 \pm 2,53	35,24 \pm 6,77
	AT + L-NAME	41,07 \pm 5,89	32,98 \pm 6,30	31,79 \pm 8,87	32,26 \pm 2,14	28,33 \pm 9,41

Legenda: AT = Alfa-tocoferol

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o alfa-tocoferol foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do L-NAME sobre a pressão arterial, perfil lipídico e mecanismo de oxi-redução no modelo animal de estudo experimental da hipertensão arterial severa e acidente vascular encefálico, o rato SHRSP. Destaca-se também, que a resposta neurológica dos animais tratados com essa vitamina foi evidentemente superior em todos os testes aplicados.

Em relação a função de memória, os testes do Labirinto Aquático de Morris e o Teste do Labirinto, apontaram um prejuízo na consolidação da memória espacial em animais submetidos a ingestão do L-NAME traduzido pela maior média de tempo no cumprimento das tarefas.

Por outro lado, os animais do grupo Alfa-tocoferol + L-NAME parecem ter tido atenuada a injúria da função de memória espacial, apresentando resultados significativamente melhores em comparação aos animais que receberam apenas o L-NAME. Comim e colaboradores (2010), relataram que a administração crônica de vitamina E melhorou a memória de ratos induzidos ao diabetes e reportaram que em animais tratados com vitamina E houve a restauração da produção de NO.

Corroborando com estes achados, estudos recentes com protocolos similares aos da tese apontaram um déficit importante na memória espacial de ratos tratados com L-NAME (BOULTADAKIS; PITSIKAS, 2010). Outros trabalhos já haviam relatado a estreita relação do L-NAME com o déficit na função de memória espacial. Um trabalho demonstrou que animais tratados com pioglitazona, uma droga utilizada para tratamento da doença de Alzheimer, e sob administração de L-NAME mantiveram um grau importante de prejuízo na função de memória, devido aos seus possíveis efeitos inibitórios na nNOS. Este fato pode confirmar o papel do óxido nítrico na sinalização molecular para a aquisição de memória espacial (ALAMI et al., 2011). Em adição, diversos autores vêm descrevendo que o L-NAME afeta a aquisição, o armazenamento e a recuperação da informação, inferindo que a inibição da nNOS pode afetar em diferentes aspectos da memória (BOULTADAKIS; GEORGIADOU; PITSIKAS, 2010).

Nos Testes de Reconhecimento de Objeto Novo (memória curta e memória longa), novamente os animais do grupo L-NAME obtiveram os menores índices de

discriminação da memória curta e da memória longa, e a média de tempo de exploração dos objetos novos foi a menor entre os grupos. Em adição, Pitsikas e colaboradores (2005) sugeriram um efeito regulador do NO sobre a liberação de serotonina (5-HT) no hipocampo. Outros achados têm demonstrado que o receptor de 5-HT está envolvido na memória de reconhecimento, e que o NO pode modular os efeitos deste receptor no aprendizado e retenção da memória. Boultsadakis, Georgiadou e Pitsikas (2010), ainda afirmaram que a inibição da nNOS também pode afetar a memória não-espacial de reconhecimento.

Recentemente, Furini e colaboradores (2010) demonstraram que a sinalização NO/ ciclase guanilato solúvel/ proteína quinase G no hipocampo é essencial na consolidação da memória de reconhecimento e sugeriram que os receptores beta-adrenérgicos ativam as vias de expressão do BDNF durante a consolidação da memória.

A função do NO supracitada pode desenhar o mecanismo de déficit encontrados nos testes de memória de reconhecimento em ratos submetidos ao L-NAME. Por outro lado, a suplementação concomitante de alfa-tocoferol, no grupo Alfa-tocoferol+L-NAME, apresentou uma média de tempo de exploração de objetos novos que permitem afirmar que os animais deste grupo tiveram uma atenuação do quadro neurológico promovido pelo L-NAME.

Os achados da tese reforçaram os efeitos neurológicos, supracitados, atribuídos ao NO, e a ação protetora do alfa-tocoferol representada pela recuperação da média de tempo de reconhecimento de objetos novos no grupo Alfa-tocoferol+L-NAME.

Segundo Wu, Ying e Gomez-Pinilla (2010), a vitamina E é hábil em modular fatores moleculares de formação de memória como o BDNF, CREB e sinapsina I. Estes fatores podem ter seus níveis reduzidos pelo o aumento do estresse oxidativo. Assim, o alfa-tocoferol ao neutralizar as reações oxidativas mantendo o metabolismo celular poderia normalizar as funções cognitivas.

Estes achados correspondem com os resultados da peroxidação lipídica descritos na tese, onde o grupo L-NAME apresentou os maiores índices de estresse oxidativo. Em contraste, os animais tratados com alfa-tocoferol apresentaram redução dos níveis do malondialdeído. Tais resultados podem ter tido influência direta nos parâmetros de memória.

De acordo com Sato e colaboradores (2010), no processo de lesão neuronal, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroxiperoxídeos lipídicos, isoprostanos-F2 e dienos conjugados estão significativamente aumentados no cérebro de ratos afetados pelo estresse oxidativo, e a atividade de enzimas antioxidantes e Vitamina E estão consideravelmente diminuídas. Em adição, este grupo de pesquisa demonstrou que ratos submetidos ao estresse oxidativo apresentaram significativo déficit nas funções de aprendizagem e memória.

Em trabalhos prévios, Xie e Sastry (1995), já haviam relatado que ratos alimentados com dieta deficiente em Vitamina E apresentavam um enfraquecimento na indução da LTP. Em 1998, Lynch também relatou que mudanças na composição das membranas, devido ao estresse oxidativo, podem contribuir significativamente para a disfunção da potenciação de longa-duração (LTP), envolvida nos processos de formação de memória.

Interessantemente, Watson e colaboradores (2006) também afirmaram que alterações no metabolismo oxidativo extracelular afetam a plasticidade sináptica no hipocampo durante o processo de envelhecimento. Evidências recentes indicam que a redução do potencial redox nos neurônios do hipocampo promove LTP deficiente (ROBILLARD et al., 2011).

Curiosamente, Sun e Alkon (2008) relataram que a enzima PKC tem influência essencial na consolidação da memória e esta pode ser inibida pelo alfa-tocoferol. Contudo, radicais livres podem ser responsáveis pela oxidação da PKC e provocar diferentes efeitos adversos limitando a capacidade de formação de memória promovida por esta enzima. Estes autores também descreveram que o alfa-tocoferol possui ação inibidora da PKC em tecidos periféricos e demonstraram que o alfa-tocoferol associado a briostatina-1 (lactona moduladora e potencializadora da PKC) apresentaram efeito sinérgico na preservação da memória de animais tratados.

Confirmando os efeitos do alfa-tocoferol no PKC das células neuronais, Yang e Wang (2008) relataram que o alfa-tocoferol aumentou os níveis da *proteína miristoilada rica em alanina (MARCKS - Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)*, o principal substrato pré-sináptico da proteína quinase C. Dessa forma, o alfa-tocoferol modularia positivamente a ativação da PKC garantindo a preservação

desta, por neutralização dos radicais livres e aumento a disponibilidade do substrato para a formação da enzima.

Entretanto, Betti e colaboradores (2011) descreveram que a suplementação com alfa-tocoferol reduziu a fosforilação da PKC e diminuiu a taxa de fosforilação da *proteína-43 associada ao crescimento* (GAP43) e da proteína MARCKS, dois substratos envolvidos com o desenvolvimento e plasticidade neural.

Apesar da controvérsia, os resultados da tese sobre a memória parecem confirmar os dados encontrados por Yang e Wang (2008) e Sun e Alkon (2008).

Nos testes para avaliação dos parâmetros sensório-motores, o protocolo aplicado nos modelos animais demonstrou claramente que o L-NAME promoveu efeitos deletérios, incorrendo com ataxia da marcha e hemiparesia irreversíveis.

Estes efeitos neurológicos adversos promovidos pelo L-NAME influenciaram diretamente na capacidade de execução das tarefas motoras de ambos os grupos tratados com este inibidor de cNOS. Apesar disso, no grupo Alfa-tocoferol+L-NAME, os resultados dos testes Sensório-Motor de Alcance, Motor de Reflexo Plantar, Reposicionamento Postural e de Queda-Livre ilustram a reversão dos efeitos deletérios do L-NAME sinalizando a recuperação das funções motoras e possível preservação neuronal.

Estes sinais de deterioração cerebral parecem estar intimamente ligados a ação sistêmica do L-NAME e a conseqüente lesão encefálica promovida pelos efeitos adversos da inibição da cNOS.

A utilização do modelo animal espontaneamente hipertenso e propenso ao AVE juntamente com o agravamento da pressão arterial sistólica promovido pelo L-NAME elevam consideravelmente a probabilidade da ocorrência do ataque isquêmico transitório e do acidente vascular encefálico promovendo lesão neuronal, manifestada pelas ocorrências neurológicas observadas na tese.

O L-NAME administrado cronicamente inibe a expressão da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase constitutiva, promovendo a perda da capacidade de vasodilatação e agravando o quadro hipertensivo. Além de competir com a L-arginina, sendo um inibidor estereoespecífico da isoforma eNOS, estudos têm apontado que o tratamento com L-NAME aumenta a fosforilação da PKC, intensificando sua atividade. Desta forma, a PKC fosforila diretamente a eNOS e

reduz sua atividade promovendo a vasoconstrição (DUSSEL; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

No entanto, neste trabalho o alfa-tocoferol foi hábil em atenuar os níveis de pressão arterial de ratos submetidos ao L-NAME diminuindo a probabilidade de desenvolvimento do AVE causado pela excessiva elevação da pressão arterial.

Este efeito protetor pode ser explicado pela provável inibição de PKC promovida pelo alfa-tocoferol, atenuando os efeitos do L-NAME e preservando, em parte, a liberação de óxido nítrico endotelial com efeitos diretos sobre a ação vasodilatadora (FREEDMAN et al., 2000).

Estudos *in vitro* com PKC recombinante têm demonstrado que a inibição pelo alfa-tocoferol não é causada pela interação entre o alfa-tocoferol e a PKC, e também não é promovida pela inibição da expressão gênica desta proteína. Autores relataram que a inibição da atividade da PKC pelo alfa-tocoferol ocorre em nível celular, onde a vitamina age promovendo a desfosforilação da isoforma PKC-alfa, via *fosfatase 2A* (PP2A) (AZZI et al., 2000).

Outros estudos têm conferido ao alfa-tocoferol uma ação hipotensora devido a sua propriedade antioxidante. Assim, Noguchi e colaboradores (2004), observaram efeito hipotensor acompanhado de menor excreção urinária de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, um marcador de estresse oxidativo, em ratos SHRSP tratados com essa vitamina. Diferentes trabalhos ainda demonstraram que após uma suplementação antioxidante houve diminuição da atividade NADPH oxidase, e um aumento da atividade da superóxido dismutase, uma enzima antioxidante de neutralização de radicais livres de oxigênio (CHEN et al., 2005).

Em trabalhos prévios realizados no laboratório onde a tese foi elaborada, Costa e Vianna (2005), usando o modelo SHR, induzido ao diabetes, também observaram uma redução significativa da pressão arterial sistólica nos ratos tratados com alfa-tocoferol. Em recentes trabalhos foi demonstrada a capacidade do alfa-tocoferol de atenuar a pressão arterial, reduzir os marcadores do estresse oxidativo e modular o perfil lipídico (GUIMARÃES et al., 2009). Este presente trabalho confirma tais ações conferidos ao alfa-tocoferol mesmo durante a inibição crônica da isoforma óxido nítrico sintase endotelial.

A teoria de manutenção funcional das estruturas endoteliais pela redução do estresse oxidativo, certamente fornece a base para a resposta hipotensora do alfa-

tocoferol, pois os mecanismos oxidantes associados a injúria do endotélio e ao desequilíbrio entre a secreção de substâncias vasoconstritoras e vasorelaxantes são neutralizados. De acordo com Fiorelli, Oliveira e Vianna (2006), a lesão provocada por radicais livres, promove a injúria dos mecanismos de troca iônica celular responsável pela homeostase das células vasculares. Dessa forma, as proteínas âncoras de membrana, tais como, a sódio-potássio ATPase (Na-KATPase), o canal de potássio, dentre outras, têm sua atividade inibida favorecendo os mecanismos vasoconstritores.

O L-NAME aumentou nitidamente os níveis de pressão arterial e a deterioração das funções neurológicas acompanharam a elevação pressórica. Em concordância com a tese, Arima e Chalmers (2011), correlacionaram o aumento da pressão arterial com aumento da incidência de AVE e do declínio cognitivo.

Contudo, apesar do alfa-tocoferol ter um papel reconhecido na expressão da eNOS, os animais tratados com Alfa-tocoferol+L-NAME apresentaram atenuação do parâmetro pressórico que parecem ter sido promovidos por um efeito, em parte, NO-independente, baseado na significativa propriedade antioxidante do alfa-tocoferol. Esta função protege o endotélio vascular, garantindo em parte, os aspectos normais de contratilidade e relaxamento arterial. Estes resultados podem indicar menor nível de lesão neuronal devido à redução da pressão sanguínea nas arteríolas cerebrais.

A ação do alfa-tocoferol na redução do estresse oxidativo, refletido nos níveis reduzidos de malondialdeído, e os níveis pressóricos atenuados podem ser considerados mecanismos protetores responsáveis pelos resultados encontrados no grupo Alfa-tocoferol + L-NAME. Tais resultados encontram base nos achados de Hisain e Halzelrigg (2002), que demonstraram através da administração crônica de L-NAME, o aumento de MDA e proteínas carboniladas, além de redução da expressão da cobre-zinco superóxido dismutase, manganês superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase e glutathiona-s-transferase.

Concomitantemente, os resultados referentes aos parâmetros coagulatórios apresentaram valores elevados de fibrinogênio e contagem de plaquetas no grupo L-NAME em comparação aos outros grupos e redução significativa dos grupos tratados com Alfa-tocoferol. A inibição crônica do óxido nítrico endotelial pelo L-NAME e o aumento na fosforilação do PKC podem aumentar a proliferação e adesão plaquetária. Em contrapartida, o alfa-tocoferol ao inibir a atividade de PKC e

ao aumentar a disponibilidade de NO pode reverter este processo (TRABER; ATKINSON, 2007).

Outros estudos apontaram que níveis aumentados de fibrinogênio foram correlacionados com a perturbação do intelecto não-verbal e da capacidade cognitiva geral (VELCHEVA; NIKOLOVA, 2008). Adicionalmente, é estabelecido na literatura, que o NO endotelial derivado da eNOS é um regulador crítico da função plaquetária *in vivo* (MOORE; SANZ-ROSA; EMERSON, 2011). Takinishi, Okazaki e Oguchi (2005) sugeriram que o tratamento com L-NAME promove o aumento dos níveis de fibrinogênio plasmáticos, através de um aumento de RNA mensageiro de fibrinogênio no fígado. Em contraste, a propriedade anticoagulante de alfa-tocoferol já havia sido proposta por Noguchi e colaboradores (2004) que descreveram a atenuação da tendência trombótica. Neste contexto, Brown, Morrice e Duthie (1994) também relataram uma redução no número de plaquetas séricas de fumantes e não-fumantes tratados com vitamina E.

Em 1989, Jandak, Steiner e Richardson já haviam relatado a diminuição da adesão plaquetária após a suplementação com alfa-tocoferol. A razão para este fenômeno, segundo os autores pode ser uma relação entre a suplementação de alfa-tocoferol e a inibição da formação pseudópodes, que facilitaria a aderência plaquetária.

Outra teoria para a explicação das propriedades anti-coagulantes de alfa-tocoferol é relatado por Klein e colaboradores (2006). Neste estudo, foi demonstrado a modulação da fosfatidilserina (PS), causada pela suplementação alfa-tocoferol. A exposição de PS na superfície das membranas celulares poderia regular numerosos processos fisiológicos no controle e na sinalização celular, incluindo apoptose e coagulação. A exposição de PS em células circulantes ou em micropartículas da membrana fornece uma superfície de lipídios para a interação com fatores de coagulação, levando a uma aceleração da formação de trombina. A vitamina E pode modificar esta externalização da PS nos eritrócitos circulantes, modulando suas propriedades pró-coagulantes *in vivo*. Tais resultados e mecanismos fornecem bases para a prevenção do AVE isquêmico pela utilização do alfa-tocoferol.

Em relação ao marcador inflamatório estudado, a lactato desidrogenase apresentou-se em valores atenuados nos animais do tratados com alfa-tocoferol. Por sua vez, o grupo L-NAME teve valores exacerbados, sendo um importante indicativo

de lesão tecidual, refletida na ataxia e hemiparesia apresentada por esse grupo e pelo aumento da incidência de escores que representavam o não-cumprimento da tarefa neurológica sinalizando o déficit motor.

Em um estudo realizado por Tsai e colaboradores (2007), animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média e tratados com resveratrol, um poderoso antioxidante, mostraram uma redução dos níveis de LDH e de volume do infarto cerebral. No entanto, quando resveratrol foi administrado em conjunto com L-NAME, houve um aumento significativo do volume do infarto cerebral e elevação dos níveis de LDH.

Corroborando com os resultados da tese, Giakoustidis e colaboradores (2002) demonstraram que o alfa-tocoferol diminui os níveis séricos de LDH e que a atividade desta enzima aumentada estava relacionada à hipóxia cerebral. Porém, a suplementação de vitamina E foi capaz de atenuar esse perfil.

Simultaneamente foi demonstrado nesse trabalho, que nos grupos tratados com Alfa-tocoferol houve importante modulação do perfil lipídico com importante elevação dos níveis do HDL-colesterol. A enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT), que esterifica o colesterol livre em lipoproteína de alta densidade (HDL), é facilmente inibida por produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (McCALL et al., 1995). Com a redução dos níveis deste aldeído a produção de HDL-colesterol pode ter sido preservada.

Este aumento nos níveis de HDL pode estar estreitamente associado à neuroproteção. Estudos em ratos com supressão do gene que expressa SR-BI (receptor responsável pela ligação entre HDL com células e liberação do alfa-tocoferol nestas células) demonstraram deficiência na potenciação de longa duração na região CA1 do hipocampo, apontando para um prejuízo na função de memória de reconhecimento e memória espacial (CHANG; RIGOTTI; HUERTA, 2009). Estes resultados são suportados pelos achados de Vatassery e colaboradores (2004) que sugeriram que o colesterol HDL tem um papel fundamental no transporte do alfa-tocoferol para o cérebro. Interessantemente, nos grupos com valores elevados de HDL houve aumento do número de células na sub-região CA1 do hipocampo.

Diante destes achados inseridos na tese, a análise histopatológica confere robustez a hipótese de neuroproteção do alfa-tocoferol. Os resultados indicaram que o alfa-tocoferol aumentou o número de células total do hipocampo, que pode ser

interpretado com a capacidade mantida de reter informações. Em contraste, o grupo L-NAME apresentou número de células reduzidas correspondendo com o prejuízo da função da memória encontrada nos testes aplicados na tese. Ferri e colaboradores (2006) sugeriram que o alfa-tocoferol pode aumentar o complexo *ácido polissialílico-molécula de adesão celular neural* (PSA-NCAM) em células do giro dentado. Cuppini e colaboradores (2002), já haviam relatado aumento de grânulos celulares no giro dentado após o tratamento com alfa-tocoferol, indicando sobrevivência de novos neurônios.

Segundo Hernández-Pinto, Puebla-Jiménez e Arilla-Ferreiro (2009), o alfa-tocoferol pode induzir a um aumento nos níveis de CREB total e CREB fosforilado no hipocampo, através da diminuição dos receptores de somatostatina. Estes efeitos também podem promover a sobrevivência de novos neurônios nesta região e induzir a consolidação de memórias.

Por outro lado, o grupo L-NAME apresentou número de células diminuídas, possivelmente pela redução da disponibilidade do óxido nítrico. Em um estudo similar, Chen e colaboradores (2005) relataram que ratos *knock-out* para eNOS submetidos ao AVE isquêmico apresentaram menor expressão de BDNF e reduzida mitose em células neuronais. Evidências recentes têm apontado a inibição do BDNF com a reduzida maturação dos neurônios da sub-região CA3 do hipocampo (ZUCCA; VALENZUELA, 2010). Estes achados podem fornecer bases para o número reduzido de neurônios da sub-região CA3 encontrados na tese.

Uma hipótese relevante para o reduzido número de células hipocámpais tem relação direta com o elevado nível de estresse oxidativo deste grupo, que pode ter influenciado também na proliferação celular da sub-região CA1. Sun e colaboradores (2010) atribuíram ao estresse oxidativo o enfraquecimento da LTP na sub-região CA1 tendo consequências diretas na plasticidade cerebral.

Outro fator determinante pode estar relacionado com as lesões cerebrais promovidas pela deterioração da fisiologia cerebrovascular. Wang e colaboradores (2005) identificaram morte neuronal na sub-região CA1 após indução do AVE por oclusão das carótidas.

Estes sinais de lesões teciduais no hipocampo destacaram-se no grupo L-NAME, quando comparados aos outros grupos do experimento. Evidentemente, tais resultados foram esperados devido à inibição crônica da isoforma eNOS e ao

consequente extravasamento dos níveis de pressão arterial com efeitos deletérios sobre a estrutura neural.

A vacuolização dos neurópilos e nódulos gliais encontrados nos ratos submetidos ao L-NAME foram também descritos como sinais de isquemia cerebral por outros autores (SNIDER et al., 2001). Porém, os nódulos gliais foram encontrados em todos os animais do experimento e podem ser descritos em condições de altos níveis pressóricos com sinalização inflamatória, sendo esta uma característica do modelo animal utilizado (EMMRICH et al., 2003). Este perfil de lesão neuronal dos SHRSP podem ser extrapolados em casos de hipertensão agravada, um dos efeitos deletérios do L-NAME, decorrendo com severo aumento da pressão sanguínea intraluminal apresentando importância clínica da disfunção da barreira hematoencefálica e acarretando com o aparecimento de degeneração fibrinóide e formação de microaneurismas (FREDRICKSSON et al., 1988).

Outras características encontradas no tecido neuronal dos animais submetidos à inibição do L-NAME como o extravasamento de hemácias, infiltrado inflamatório e os astrócitos reativos também foram apresentados em trabalhos recentes relativos à isquemia cerebral induzida (SUN et al., 2010; DUCRUET et al., 2011; SHIMADA et al., 2011).

A truncada rede neural de conexões nervosas e os sinais de lesão neuronal associados à observação evidente de ataxia, hemiparesia e déficit motor indicaram que o L-NAME desempenhou um papel fundamental na injúria cerebral dos ratos SHRSP com reflexo nas funções motoras e cognitivas. No entanto, quando o alfa-tocoferol foi administrado juntamente com o L-NAME não foram encontradas lesões semelhantes.

Yamamoto e colaboradores (1983) descreveram decréscimo significativo na peroxidação lipídica em ratos SHR induzidos ao AVE por oclusão das carótidas e tratados com alfa-tocoferol. Adicionalmente, Crouzin e colaboradores (2010), relataram que o alfa-tocoferol é um inibidor dos canais receptores potencial-trasitórios vanilóides-1, envolvidos com elevado influxo de cálcio e morte celular. Estes canais se formam em presença de meio ácido (pós-isquemia cerebral) e podem ser favorecidos pelo meio oxidativo. O alfa-tocoferol ao neutralizar os agentes oxidativos poderia reduzir ou inibir a formação dos canais preservando o tecido cerebral. Estes resultados histopatológicos condizem com as análises dos

testes neurológicos podendo conferir ao alfa-tocoferol o *status* de agente neuroprotetor.

Contudo, encontramos na tese limitações na análise histopatológica encefálica que impedem as caracterizações histopatológicas aprofundadas e a identificação especializada na contagem de células, incluindo a região do giro denteado, porém, fica evidente o melhor desempenho da resposta neurológica nos grupos tratados com Alfa-tocoferol.

Assim, as evidências científicas do trabalho aqui apresentado demonstraram que ambos os grupos suplementados com L-NAME foram acometidos de distúrbios neurológicos com maior complicação dos fatores de risco do AVE. Entretanto, o grupo que recebeu o tratamento concomitante com o alfa-tocoferol apresentou atenuação significativa de todos os fatores de risco estudados e um perfil neurológico menos comprometido com reversão dos efeitos deletérios do L-NAME.

Com base nestes achados, podemos conferir a propriedade antioxidante do alfa-tocoferol, refletida na diminuição dos níveis de malondialdeído, como o principal mecanismo modulador dos fatores de risco do AVE e neuroprotetor das estruturas responsáveis pelo processamento da memória.

7 CONCLUSÃO

A inibição das isoformas eNOS e nNOS pelo L-NAME, promoveu déficits nas funções motoras e de formação de memória. Além disso, houve um expressivo acréscimo nos níveis de pressão arterial, e uma série alterações bioquímicas que agravaram os fatores de risco do AVE.

Contudo, os resultados da presente tese demonstraram que o alfa-tocoferol preservou a memória e reverteu déficits sensório-motores causados pela administração do L-NAME, com indicativo histopatológico de proteção estrutural do tecido cerebral e considerável aumento no número de células do hipocampo. Esta vitamina ainda foi hábil em atenuar os efeitos deletérios da inibição da isoforma eNOS nos fatores de risco do AVE.

Em conclusão, o alfa-tocoferol pode ser considerado um modulador dos fatores de risco do AVE e um agente neuroprotetor com função de preservação das estruturas e funções cerebrais.

REFERÊNCIAS

- ABOU-DONIA, M.B.; DECHKOVSKAIA, A.M.; GOLDSTEIN, L.B. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, [S.l.], v. 72, p. 881-890, 2002.
- ALLAMI, N.; JAVADI-PAYDAR, N.; RAYATNIA, F.; SEHHAT, K.; RAHIMIAN, R.; NOROUZI, A.; DEHPOUR, A.R. Suppression of nitric oxide synthesis by L-NAME reverses the beneficial effects of pioglitazone on scopolamine-induced memory impairment in mice. *European Journal of Pharmacology*, [S.l.], v. 650, p. 240-248, 2011.
- ALVAREZ-PEREZ, F.J.; CASTELO-BRANCO, M.; ALVAREZ-SABIN, J. Usefulness of measurement of fibrinogen, D-dimer, D-dimer/fibrinogen ratio, C reactive protein and erythrocyte sedimentation rate to assess the pathophysiology and mechanism of ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, [S.l.], v. 89, n. 9, p. 986-992, 2011.
- ANDRADE, J.P.; VILAS-BOAS, F.; CHAGAS, H.; ANDRADE, M. Epidemiological aspects of adherence to the treatment of hypertension. *Arq Bras Cardiol.*, [S.l.], v. 79, n. 4, p. 375-84, 2002.
- ARADILLAS, E.; LIBON, D.J.; SCHWARTZMAN, R.J. Acute loss of spatial navigational skills in a case of a right posterior hippocampus stroke. *J Neurol Sci.*, [S.l.], v. 308, n. 1-2, p. 144-146, 2011.
- ARIMA, H.; CHALMERS, J. Progress: Prevention of Recurrent Stroke. *The Journal of Clinical Hypertension*, [S.l.], v. 13, n. 9, p. 693-702, 2011.
- ASHENAGAR, M.S.; TABUCHI, M.; KINOSHITA, K.; OOSHIMA, K.; NIWA, A.; WATANABE, Y.; YOSHIDA, M.; SHIMADA, K.; YASUNAGA, T.; YAMANISHI, H.; HIGASHINO, H. Gene expression in the adrenal glands of three spontaneously hypertensive rat substrains. *Mol Med Report.*, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 213-222, 2010.
- ATKINSON, J.; HARROUN, T.; WASSALL, S.R.; STILLWELL, W.; KATSARAS, J. The location and behavior of α -tocopherol in membranes. *Mol. Nutr. Food Res.*, [S.l.], v. 54, p. 641-651, 2010.
- AZZI, A.; BREYER, I.; FEHER, M.; PASTORI, M.; RICCIARELLI, R.; SPYCHER, S.; STAFFIERI, M.; STOCKER, A.; ZIMMER, S.; ZINGG, J.M. Specific Cellular Responses to α -Tocopherol. *J. Nutr.*, [S.l.], v. 130, p. 1649-1652, 2000.

BAILEY, E.L.; WARDLAW, J.M.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A.F.; SUDLOW, C.L.; SMITH, C. Cerebral small vessel endothelial structural changes predate hypertension in Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats: a blinded, controlled immunohistochemical study of 5-21 week old rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* [S.I.], v. 37, n. 7, p. 711-726, 2011.

BARRETO, R.L.; CORREIA C.R.; MUSCARA, M.N. Oxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim. Nova*, [S.I.], v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BEAR, M.F.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.*, [S.I.], v. 4, p. 389 -399, 1994.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, [S.I.], v. 271, p. 1424-37, 1996.

BETTI, M.; AMBROGINIA, P.; MINELLIA, A.; FLORIDIB, A.; LATTANZIA, D.; CIUFFOLIA, S.; BUCHERELLIC, C.; PROSPEROD, E.; FRONTINIE, A.; SANTARELLIF, L.; BALDIC, E.; BENETTIG, F.; GALLIB, F.; CUPPINIA, R. Maternal dietary loads of α -tocopherol depress protein kinase C signaling and synaptic plasticity in rat postnatal developing hippocampus and promote permanent deficits in adult offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, [S.I.], v. 22, p. 60-70, 2011.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, [S.I.], v. 361, n. 6407, p. 31-39, 1993.

BOULTADAKIS, A.; GEORGIADOU, G.; PITSIKAS, N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on different memory components as assessed in the object recognition task in the rat. *Behav Brain Res.*, [S.I.], v. 207, n. 1, p. 208-214, 2010.

BOULTADAKIS, A.; PITSIKAS, N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat. *Neuropsychopharmacology*, [S.I.], v. 35, n. 12, p. 2357-2366, 2010.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*, [S.I.], v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BRIJESH, R.; RAVINDRAN, G. A Spiking neural network of the CA3 of the hippocampus can be a neural prosthesis for lost cognitive functions. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, [S.I.], v. 4, p. 755-758, 2007.

BRONNER, L.L.; KANTER, D.S.; MANSON, J.E. Primary prevention of stroke. *New England J. Med.*, [S.I.], v. 333, p. 1392-1400, 1995.

BROUGHTON, B.R.S.; REUTENS, D.C; SOBEY, C.G. Comments, Opinions, and Reviews. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, [S.I.], v. 40, p. 331-339, 2009.

BROWN, K.M.; MORRICE, P.C.; DUTHIE, G.G. Vitamin E supplementation suppresses indexes of lipid peroxidation and platelet counts in blood of smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. *Am J Clin Nutr.*, [S.I.], v. 60, n. 3, p. 383-387, 1994.

CAI, H.; GRIENGLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NADPH oxidases as therapeutic targets in the cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.*, [S.I.], v. 24, n. 9, p. 471-478, 2003.

CARDENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev. Biochem.*, [S.I.], v. 58, p.79-110, 1989.

CARLSWELL, H.V.O.; ANDERSON, N.H.; CLARK, J.S.; GRAHAM, D.; JEFFS, B.; DOMINICZAK, A.F.; MACRAE, I.M. Genetic and gender influences on sensitivity to focal cerebral ischemia in the Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*, [S.I.], v. 33, p. 681-685, 1999.

CASTILLO, J.; RAMA, R.; DÁVALOS, A. Nitric Oxide-Related Brain Damage in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, [S.I.], v. 31; p.852-857, 2000.

CHANG, E.H.; RIGOTTI, A.; HUERTA, P.T. Age-related influence of the HDL receptor SR-BI on synaptic plasticity and cognition. *Neurobiol Aging.*, [S.I.], v. 30, n. 3, p. 407-419, 2009.

CHEN, J.; ZACHAREK, A.; ZHANG, C.; JIANG, H.; LI, Y.; ROBERTS, C.; LU, M.; KAPKE, A.; CHOPP, M. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci.*, [S.I.], v. 25, n. 9, p. 2366-2375, 2005.

CHILLON; J.M.; BAUMBACH, G.L. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens.*, [S.I.], v. 22, n.3, p.529-34, 2004.

CHING, S.; MAHAN, D.C.; WISEMAN, T.G.; FASTINGER, N.D. Evaluating the antioxidant status of weanling pigs fed dietary vitamins A and E. *J Anim Sci.*, [S.I.], v. 80, n. 9, p. 2396-401, 2002.

CLAUSS, A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta haematologica*, [S.I.], v. 17, p. 237-246, 1957.

COMIN, D.; GAZARINI, L.; ZANONI, J.N.; MILANI, H.; DE OLIVEIRA, R.M. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behav Brain Res.*, [S.I.], v. 210, n. 1, p. 38-45, 2010.

COSTA, V.A.; VIANNA, L.M. Effects of alpha-tocopherol supplementation on blood pressure and lipidic profile in streptozotocin-induced diabetes mellitus in spontaneously hypertension rats. *Clin Chim Acta*, [S.I.], v. 351, n. 1-2, p. 101-104, 2005.

CROUZIN, N.; FERREIRA, M.C.; COHEN-SOLAL, C.; BARBANEL, G.; GUIRAMAND, J.; VIGNES, M. Neuroprotection induced by vitamin E against oxidative stress in hippocampal neurons: involvement of TRPV1 channels. *Mol Nutr Food Res.*, [S.I.], v. 54, n. 4, p. 496-505, 2010.

CUPPINI, R.; CIARONI, S.; CECCHINI, T.; AMBROGINI, P.; FERRI, P.; CUPPINI, C.; NINFALI, P.; DEL GRANDE, P. Tocopherols enhance neurogenesis in dentate gyrus of adult rats. *Int J Vitam Nutr Res.*, [S.I.], v. 72, n. 3, p. 170-176, 2002.

CURRÁS-COLLAZO, M.C. Nitric oxide signaling as a common target of organohalogen and other neuroendocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, [S.I.], Part B, v. 14, p. 495-536, 2011.

CUSHMAN, M.; YANEZ, D.; PSATY, B.M.; FRIED, U.P.; HEISS, G.; LEE, M. POLAK, J.F.; SAVAGE, P.J.; TRACY, R.P. Association of Fibrinogen and Coagulation Factors VII and VIII with Cardiovascular Risk Factors in the Elderly: The Cardiovascular Health Study for the Cardiovascular Health Study Investigators. *Am J Epidemiol.*, [S.I.], v. 143, n. 7, p. 665-676, 1996.

DONNAN, G.A.; ZAPF, P.; DOYLE, A.E.; BLADIN, P.F. CSF enzymes in lacunar and cortical stroke. *Stroke*. [S.I.], v. 14, n. 2, p. 266-269, 1983.

DUCRUET, A.F.; SOSUNOV, S.A.; VISOVATTI, S.H.; PETROVIC-DJERGOVIC, D.; MACK, W.J.; CONNOLLY, E.S.; PINSKY, D.J. Paradoxical exacerbation of neuronal injury in reperfused stroke despite improved blood flow and reduced inflammation in early growth response-1 gene-deleted mice. *Neurol Res.*, [S.I.], v. 33, n. 7, p. 717-725, 2011.

DUSSEL, M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.*, [S.I.], v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ELEJALDE-GUERRA, J.I. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna*, [S.I.], v. 18, n. 6, p. 326-335, 2001.

EMMRICH, P.; HAHN, J.; OGUNLADE, V.; GEIGER, K.; SCHOBER, R.; MOHR, F.W. Neuropathological findings after cardiac surgery-retrospective study over 6 years. *Z Kardiol.*, [S.I.], v. 92, n. 11, p. 925-937, 2003.

EMMERT, D.H.; KIRCHNER, J.T. The role of vitamin E in the prevention of heart disease. *Arch Farm Med.*, [S.I.], v. 8, n. 6, p. 537-542, 1999.

EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Lesão de isquemia-reperfusão aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol*, [S.I.], v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

FARAJI, J.; METZ, G.A.; SUTHERLAND, R.J. Stress after hippocampal stroke enhances spatial performance in rats. *Physiol Behav.*, [S.I.], v. 102, n. 4, p. 389-399, 2011.

FEIGIN, V.L.; LAWES, C.M.; BENNETT, D.A.; ANDERSON, C.S. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol.*, [S.I.], v. 2, p. 43-53, 2003.

FERRI, P.; CECCHINI, T.; AMBROGINI, P.; BETTI, M.; CUPPINI, R.; DEL GRANDE, P.; CIARONI, S. alpha-Tocopherol affects neuronal plasticity in adult rat dentate gyrus: the possible role of PKCdelta. *J Neurobiol.*, [S.I.], v. 66, n. 8, p. 793-810, 2006.

FILIPPIN, L.I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N.P.; XAVIER, R.M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Rev Bras Reumatol*, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

FIORELLI, S.; OLIVEIRA, C.A.B.; VIANNA, L.M. Vitaminas antioxidantes: ácido ascórbico, tocoferol e caroteno apresentam efeito protetor no infarto cerebral. *Cadernos Brasileiros de Medicina*, [S.l.], v. 17, p. 177-181, 2006.

FRAGA, C.G.; SHIGENAGA, M.K.; PARK, J.W. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, [S.l.], v. 87, n. 12, p. 4533-4537, 1990.

FRANCO, G. *Tabela de Composição Química de Alimentos*. 9ª ed, Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2007.

FREDRIKSSON, K.; NORDBORG, C.; KALIMO, H.; OLSSON, Y.; JOHANSSON, B.B. Cerebral microangiopathy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol.*, [S.l.], v. 75, n. 3, p. 241-252, 1988.

FREEDMAN, J.E.; LI, L.; SAUTER, R.; KEANEYJR, J.F. α -Tocopherol and protein kinase C inhibition enhance platelet-derived nitric oxide release. *The FASEB J.*, [S.l.], v. 14, n. 15, p. 2377-2379, 2000.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.*, [S.l.], v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982.

FREY, U.; HUANG, Y.Y.; KANDEL, E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*, [S.l.], v. 260, p. 1661-1664, 1993.

FUJIMOTO S.T.; LONGHI, L.; SAATMAN, K.E. Motor and function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, [S.l.], v. 28, p. 365-378, 2004.

FUKUDA, S; TSUCHIKURA, S; IIDA, H. Age related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. *Exp Anim*, [S.l.], v. 53, n.1, p. 67-72, 2004.

FURINI, C.R.; ROSSATO, J.I.; BITENCOURT, L.L.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. β -Adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus.*, [S.l.], v. 20, p. 672-683, 2010.

FURUKAWA, T.S; MATHIAS, T.A.F.; MARCON, S.S. Mortalidade por doenças cerebrovasculares por residência e local de ocorrência do óbito: Paraná, Brasil, 2007. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 27, n.2, p.327-334, 2011.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 65-86, 1989.

GAUR V, KUMAR A. Effect of nonselective and selective COX-2 inhibitors on memory dysfunction, glutathione system, and tumor necrosis factor alpha level against cerebral ischemia reperfusion injury. *Drug Chem Toxicol.*, [S.I.], 2011. *In press*

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. *Cardiovasc. Research*, [S.I.], v. 55, p. 250-260, 2002.

GIAKOUSTIDIS, D.; PAPAGEORGIU, G.; ILIADIS, S.; KONTOS, N.; KOSTOPOULOU, E.; PAPACHRESTOU, A. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury *World J Surg.*, [S.I.], v. 26, n. 7, p. 872-877, 2002.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Abordagem das doenças cerebrovasculares*. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 2ª edição, São Paulo: Elsevier, 2005. p. 2667-2668.

GRATTON, J.A.; SAUTER, A.; RUDIN, M.; LEES, K.R.; MCCOLL, J.; REID, J.L.; DOMINICZAK, A.F.; MACRAE, I.M. Susceptibility to Cerebral Infarction in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat Is Inherited as a Dominant Trait, *Stroke*, [S.I.], v. 29, p. 690-694, 1998.

GUIMARÃES, M.R.M.; MURAD, L.B.; CASTRO, R.B.; VIANNA, L.M. Oral treatment with alpha-tocopherol reduces systolic blood pressure, oxidative stress and modulates lipid profile of stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Current Topics in Nutraceutical Research.*, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 41-44, 2009.

GURSOY-OZDEMIR, Y.; BOLAY, H.; SARIBAS, O.; DALKARA, T. Role of Endothelial Nitric Oxide Generation and Peroxynitrite Formation in Reperfusion Injury After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*. [S.I.], v. 31, p. 1974-1981, 2000.

HAAPANIEMI, H.; HILLBOM, M.; JUVELA, S. Lifestyle-associated risk factors for acute brain infarction among persons of working age. *Stroke*. [S.I.], v. 28, n. 1, p. 26-30, 1997.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, [S.I.], v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HAMER, M.; BATTY, G.D.; STAMATAKIS, E.; KIVIMAKI, M. Comparison of risk factors for fatal stroke and ischemic heart disease: A prospective follow up of the health survey for England. *Atherosclerosis*. [S.I.], 2011. In press.

HATTORI, K.; LEE, H.; HURN, P.D.; CRAIN, B.J.; TRAYSTMAN, R.J.; DEVRIES, A.C. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. [S.I.], v. 31, n. 8, p. 1939-1944, 2000.

HERNÁNDEZ-PINTO, A.M.; PUEBLA-JIMÉNEZ, L.; ARILLA-FERREIRO, E. Alpha-Tocopherol decreases the somatostatin receptor-effector system and increases the cyclic AMP/cyclic AMP response element binding protein pathway in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*., [S.I.], v. 162, n. 1, p. 106-17, 2009.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Bioche.*, [S.I.], v. 57, n. 2, p. 43-56, 2001.

HODIS, H.N.; MACK, W.J.; LABREE, L.; MAHRER, P.R.; SEVANIAN, A.; LIU, C.R.; LIU, C.H.; HWANG, J.; SELZER, R.H.; AZEN, S.P. Alpha-tocopherol supplementation in health individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis. The vitamin E atherosclerosis prevention study (VEAPS). *Circulation*., [S.I.], v. 106, p. 1453-1459, 2002.

HOUSTON, M.C. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.*, [S.I.], v. 47, n. 6, p. 396-449, 2005.

HUSAIN, K.; HAZELRIGG, S.R. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta.*, [S.I.], v. 1587, n. 1, p. 75-82, 2002.

IKEDA, K.; NEGISHI, H.; YAMORI, Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology*., [S.I.], v. 189, p. 55-61, 2003.

ISO, H.; JACOBS, D.R.; WENTWORTH, D.; NEATON, J.D.; COHEN, J.D. Serum cholesterol levels and the six-year mortality from stroke in 350977 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *N Engl J Med.*, [S.I.], v. 320, n. 14, p. 904-910, 1989.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.*, [S.I.], v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JANDAK, J.; STEINER, M.; RICHARDSON, P.D. α -Tocopherol, an Effective Inhibitor of Platelet Adhesion *Blood.*, [S.I.], v. 73, p. 141-149, 1989.

JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation.*, [S.I.], v. 107, n. 7, p. 926-928, 2003.

KAGAN, A.; POPPER, J.S.; RHOADS, G.G., YANO, K. Dietary and other risk factors for stroke in Hawaiian Japanese men. *Stroke.*, [S.I.], v. 16, n. 3, p. 390-396, 1985.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* [S.I.], v. 294, p. 1030-1038, 2001.

KEANEY, J.F.; SIMON, D.I.; FREEDMAN, J.E. Vitamin E and vascular homeostasis: implication for atherosclerosis. *FASEB.* [S.I.], v. 13, n. 9, p. 965-975, 1999.

KEMP, A.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.*, [S.I.], v. 30, n. 3, p. 111-118, 2007.

KIMURA, S.; SAITO, H.; MINAMI, M.; TOGASHI, H.; NAKAMURA, N.; NEMOTO, M.; PARVEZ, H.S. Pathogenesis of vascular dementia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology.*, [S.I.], v. 153, n. 1-3, p. 167-178, 2000.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KIMURA, Y. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation.*, [S.I.], v. 109, p. 2357-2362, 2004.

KLEIN, A.; DECKERT, V.; SCHNEIDER, M.; DUTRILLAUX, F.; HAMMANN, A.; ATHIAS, A. α -Tocopherol Modulates Phosphatidylserine Externalization in Erythrocytes. Relevance in Phospholipid Transfer Protein-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, [S.I.], v. 26, p. 2160-2167, 2006.

KOEHL, M.; ABROUS, N.D. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience.*, [S.I.], v. 33, p. 1101-1114, 2011.

KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep*, [S.I.], v. 6, n. 4, p. 229-234, 2001.

KRAMER, J.K.G.; FOUCHARD, R.C.; KALLURY, K.M.R. Determination of vitamin E forms in tissues and diets by high-performance liquid chromatography using normal-phase diol column. *Meth Enzymol.*, [S.I.], v. 299, p. 318-329, 1999.

KUBO-INOUE, M.; EGASHIRA, K.; USUI, M.; TAKEMOTO, M.; OHTANI, K.; KATOH, M.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Long-term inhibition of nitric oxide synthesis increases arterial thrombogenicity in rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, [S.I.], v. 282, n. 4, p. 1478-1484, 2002.

LEMAIRE-EWING, S.; DESRUMAUX, C.; NEEL, D.; LAURENT LAGROST, L. Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is a-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Mol. Nutr. Food Res.*, [S.I.], v. 54, p. 631-640, 2010.

LEPPÄLÄ, J.M.; VIRTAMO, J.; FOGELHOLM, R.; ALBANÈS, D.; HEINONEN, O.P. Different risk factors for different stroke subtypes. Association of blood pressure, cholesterol and antioxidants. *Stroke*. [S.I.], v. 30, n. 12, p. 2535-2540, 1999.

LEUNER, B.; WADDELL, J.; GOULD, E.; SHORS, T.J. Temporal discontinuity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. *J. Neurosci.*, [S.I.], v. 26, p. 13437-13442, 2006.

LINDERSTROM, E.; BOYSEN, G.; NYBOE, J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen city heart study. *Br Med J.*, [S.I.], v. 309, p. 11-15, 1994.

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.*, [S.I.], v. 9, n. 1, p. 119-131, 1999.

LOWENSTEIN, C.J.; DINERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.*, [S.I.], v. 20, n. 3, p. 227-37, 1994.

LYNCH, M.A. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: a role for the cytokine, interleukin-1 beta? *Prog Neurobiol.*, [S.I.], v. 56, n. 5, p. 571-589, 1998.

MAJLESSI, N.; CHOOPANI, S.; BOZORGMEHR, T.; AZIZI, Z. Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. *Neurobiol Learn Mem.*, [S.I.], v. 90, n. 2, p. 413-419, 2008.

MAJLESSI, N.; KADKHODAEI, M.; PARVIZ, M.; NAGHDI, N. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res.*, [S.I.], v. 963, n. 1-2, p. 244-251, 2003.

MALINOW R. Transmission between pairs of hippocampal slice neurons: quantal levels, oscillations, and LTP. *Science.*, [S.I.], v. 252, n. 5006, p. 722-724, 1991.

MANAHAN-VAUGHAN, D.; BRAUNEWELL, K.H. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci USA*, [S.I.], v. 96, p. 8739-8744, 1999.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.*, [S.I.], v. 78, p. 927-930, 1994.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; RODRÍGUEZ-DURÁNA, L.F.; ESCOBAR, M.L. Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory:BDNF requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.*, [S.I.], v. 5, p. 1-6, 2011.

MAYER, S.A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral hemorrhage. *Lancet Neurol.*, [S.I.], v. 4, n. 4, p. 662-672, 2005.

McBRIDE, M.W.; BROSANAN, M.J.; MATHERS, J.; McLELLAN, L.I.; MILLER, W.H.; GRAHAM, D.; HANLON, N.; HAMILTON, C.A.; POLKE, J.M.; LEE, W.K.; DOMINICZAK, A.F. Reduction of *Gstm1* Expression in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rat Contributes to Increased Oxidative Stress. *Hypertension.*, [S.I.], v. 45, n. 4, p. 786-792, 2005.

McCALL, M.R.; TANG, J.Y.; BIELICKI, J.K.; FORTE, T.M. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, [S.I.], v. 15, n. 10, p. 1599-1606, 1995.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) . *J Biol Chem*, [S.I.], v. 244, n. 22, p. 6049-6065, 1969.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *J Biol Chem*, [S.I.], v. 243, n. 21, p. 5753-5760, 1968.

McDONALD, R.J.; CRAIG, L.A.; HONG, N.S. Enhanced cell death in hippocampus and emergence of cognitive impairments following a localized mini-stroke in hippocampus if preceded by a previous episode of acute stress. *European Journal of Neuroscience*, [S.I.], v. 27, p. 2197-2209, 2008.

MCINTRE, M.; HAMILTON, C.; REES, D. Sex difference in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension*, [S.I.], v. 30, p. 1517-1524, 1997.

MICHIHARA, A.; SAWAMURA, M.; YAMORI, Y.; AKASAKI, K.; TSUJI, H. Comparison of Subcellular Distribution of Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase between Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat and Wistar Kyoto Rat. *Biol. Pharm. Bull.*, [S.I.], v. 25, n. 6, p. 734-737, 2002.

MINAMI, M.; TOGASHI, H.; KOIKE, Y. Changes in ambulation and drinking behavior related to stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke.*, [S.I.], v. 16, p. 44-48, 1985.

MISHIMA, K.; PU, F.; KANEKO, T.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Ischemic administration [correction of administration] of NG-nitro-L-arginine prevents spatial memory impairments and apoptosis by an inhibition of a delayed increase in NOx- in the hippocampus following repeated cerebral ischemia. *Neuropharmacology*. [S.I.], v. 44, n. 4, p. 533-540, 2003.

MISHRA, G.D.; MALIK, N.S.; PAUL, A.A.; WADSWORTH, M.E.; BOLTON-SMITH, C. Childhood and adult dietary vitamin E intake and cardiovascular risk factors in mid-life in the 1946 British Birth Cohort. *Eur J Clin Nutr.*, [S.I.], v. 57, p. 1418-1425, 2003.

MIYAMOTO, K.; SHIOZAKI, M.; SHIBATA, M.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; GOTOW, T. Very-high-dose α -tocopherol supplementation increases blood pressure and causes possible adverse central nervous system effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Neurosci Res.*, [S.I.], v. 87, n. 2, p. 556-566, 2009.

MONCADA, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews.*, [S.I.], v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, [S.I.], v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.*, [S.I.], v. 49, n. 2, p. 137-142, 1997.

MOORE, C.; SANZ-ROSA, D.; EMERSON, M. Distinct role and location of the endothelial isoform of nitric oxide synthase in regulating platelet aggregation in males and females in vivo. *Eur J Pharmacol.*, [S.I.], v. 651, n. 1-3, p. 152-158, 2011.

MOREIRA, R.O.; SANTOS, R.D.; MARTINEZ, L.; SALDANHA, F.C.; PIMENTA, J.L.A.C.; FEIJOO, J.; JAHNKE, N.; MANGILE, O.C.; KUPFER, R. Perfil lipídico de pacientes com alto risco para eventos cardiovasculares na prática clínica diária. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, [S.I.], v. 50, n. 3, p. 481-489, 2005.

MORGADO-BERNAL, I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience*, [S.I.], v. 176, p. 12-19, 2011.

MUMBY, D.G. Object Recognition. In: WHISHAW, I.Q.; BRYAN, K. *The behavior of the laboratory rat*. New York: Oxford University Press, 2005. p. 383-391.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E - myth or reality? *J. Cell. Mol. Med.*, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 59-76, 2004.

MURAD, F.; ISHII, K.; FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L.; KERWIN, J.F. JR.; POLLOCK, J.; HELLER, M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, [S.I.], v. 24, p. 441-448, 1990.

NAIR, R.D.; LINCOLN, N.B. Cognitive rehabilitation for memory deficits following stroke. *Cochrane Database Syst Rev.*, [S.I.], v. 18, n. 3, p. 227-233, 2007.

NANETTI, L.; TAFFI, R.; VIGNINI, A. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem.*, [S.I.], v. 303, n. 1-2, p. 19-25, 2007.

NANETTI, L.; RAFFAELLI, F.; VIGNINI, V.; PEROZZI, C.; SILVESTRINI, M.; BARTOLINI, M.; PROVINCIALI, L.; MAZZANTI, L. Oxidative stress in ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest*, [S.I.], 2011. *In press*.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Publication No. 85-23, revised 1996.

NAVON, H.; BROMBERG, Y.; SPERLING, O.; SHANI, E. Neuroprotection by NMDA Preconditioning Against Glutamate Cytotoxicity is Mediated Through Activation of ERK 1/2, Inactivation of JNK, and by Prevention of Glutamate-Induced CREB Inactivation. *J Mol Neurosci.*, [S.I.], 2011. *In press*.

NTAIOS, G.; GURER, O.; FAOUZI, M.; AUBERT, C.; MICHEL, P. Hypertension is an independent predictor of mean platelet volume in patients with acute ischaemic stroke. *Intern Med J.*, [S.I.], v. 41, n. 9, p. 691-695, 2011.

NOGUCHI, T.; IKEDA, K.; SASAKI, Y.; YAMAMOTO, J.; YAMORI, Y. Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, [S.I.], v. 31, n. Suppl 2, p. S24-S26, 2004.

NÓVAK, E.M.; ZÉTOLA, V.H.F.; MUZZIO, J.A. et al. Conhecimento leigo sobre doença vascular encefálica. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 61, n. 3-B, p. 772-776, 2003.

OKAMOTO, K.; YAMORI, Y.; NAGOAKA, A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*, [S.I.], v. 34, n. S1, p. 143-153, 1974.

OMS. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. p.18-19, Suíça, 2004.

OTA, K.T.; MONSEY, M.S.; WU, M.S.; SCHAFE, G.E. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling regulate pre- and postsynaptic alterations at rat lateral amygdale synapses following fear conditioning. *PLoS One*, [S.I.], p. 1236-1250, 2010.

OZER, N.K.; PALOZZA, P.; BOSCOBOINIK, D.; AZZI, A. D-alpha-tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein C kinase activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, [S.I.], v. 322, n. 3, p. 307-10, 1993.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidase, reactive oxygen species and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.*, [S.I.], v. 31 n. 2, p. 170-180, 2008.

PAWLAK, K.; PAWLAW, D.; MYSLIWIEEC, M. Method of dialysis therapy and selected markers of oxidative stress and endothelial injury in patients with chronic renal failure. *Pol Arch Med Wewn.*, [S.I.], v. 113, n. 1, p. 21-26, 2005.

PERKOVIC, V.; NINOMIYA, T.; ARIMA, H.; GALLAGHER, M.; JARDINE, M.; CASS, A.; NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHALMERS, J. Chronic kidney disease, cardiovascular events, and the effects of perindopril-based blood pressure lowering: data from the PROGRESS study. *J Am Soc Nephrol.*, [S.I.], v. 18, n. 10, p. 2766-2772, 2007.

PITSIKAS, N.; TSITSIRIGOU, S.; ZISOPOULOU, S.; SAKELLARIDIS, N. The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioural effects by the nitrergic system. *Behav Brain Res.*, [S.I.], v. 159, n. 2, p. 287-293, 2005.

PONG K. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opin Biol Ther.*, [S.I.], v. 3, n. 1 p. 127-139, 2003.

PRATICÒ, D. Antioxidants and endothelium protection: Review. *Atherosclerosis*, [S.I.], v. 181, p. 215-224, 2005.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MC NAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. *Neuroscience*, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2004. p. 733-753.

RAZA, S.S.; KHAN, M.M.; ASHAFAQ, M.; AHMAD, A.; KHUWAJA, G.; KHAN, A.; SIDDIQUI, M.S.; SAFHI, M.M.; ISLAM, F. Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: A behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. *Journal of the Neurological Sciences*, [S.I.], v. 309, p. 45-54, 2011.

REDON, J.; OLIVA, M.R.; TORMOS, C.; GINER, V.; CHAVES, J.; IRADI, A.; SÁEZ, G.T. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.*, [S.I.], v. 41, n. 5, p. 1096-1101, 2003.

REED, D.M. The paradox of high risk of stroke in population with low risk of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.*, [S.I.], v. 131, n. 4, p. 579-588, 1989.

RENNING, P.; SORTEBERG, W.; NAKSTAD, P.; RUSSELL, D.; HELSETH, E. Aspects of intracerebral hematomas - an update. *Acta Neurol Scand.*, [S.I.], v. 118, n. 6, p. 347-361, 2008.

ROBILLARD, J.M.; GORDON, G.R.; CHOI, H.B.; CHRISTIE, B.R.; MACVICAR, B.A. Glutathione restores the mechanism of synaptic plasticity in aged mice to that of the adult. *PLoS One.*, [S.I.], v. 6, n. 5, e20676, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; MARTÍN, A. Stroke: roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants. *Nutr Res Rev.*, [S.I.], v. 22, n. 1, p. 49-67, 2009.

SATO, H.; TAKAHASHI, T.; SUMITANI, K.; TAKATSU, H.; URANO, S. Glucocorticoids generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, leading to Impairment of Cognitive Function of Rats *J. Clin. Biochem. Nutr.*, [S.I.], v. 47, p. 224-232, 2010.

SCHREIBER, S.; BUECHE, C.Z.; GARZ, C.; KROPF, S.; ANGESTEIN, F.; GOLDSCHMIDT, J.; NEUMANN, J.; HEINZE, H.J.; GOERTLER, M.; REYMAN, K.G.; BRAUN, H. The pathologic cascade of cerebrovascular lesions in SHRSP: is erythrocyte accumulation an early phase? *J Cereb Blood Flow Metab.*, [S.I.], 2011. *In press.*

SEKIGUCHI, F.; YAMAMOTO, K.; MATSUDA, K.; KAWATA, K.; NEGISHI, M.; SHINOMIYA, K.; SHIMAMURA, K.; SUNANO, S. Endothelium-Dependent Relaxation in Pulmonary Arteries of L-NAME-Treated Wistar and Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Smooth Muscle Res.*, [S.I.], v. 38, n. 4, p. 131-144, 2002.

SESSO, H.D.; BURING, J.E.; CHRISTEN, W.G.; KURTH, T.; BELANGER, C.; MACFADYEN, J.; BUBES, V.; MANSON, J.E.; GLYNN, R.J.; GAZIANO, M. Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial. *JAMA*, [S.I.], v. 300, n. 18, p. 2123-2133, 2008.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. *Tratado de Nutrição na Saúde e na Doença*. 9ª Ed. São Paulo: Editora Manole, 2003. p. 801-811.

SHIMADA, I.S.; BORDERS, A.; ARONSHTAM, A.; SPEES, J.L. Proliferating reactive astrocytes are regulated by notch-1 in the peri-infarct area after stroke. *Stroke.*, [S.I.], v. 42, n. 11, p. 3231-3237, 2011.

SHUKLA, V.; MISHRA, S.K.; PANT, H.C. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.*, [S.I.], 2011, *In press.*

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.*, [S.I.], v. 15, n. 1, p. 1-15, 1994.

SINGH, B.M.; MEHTA, J.L. Interaction between renin-angiotensin system and dyslipidemia. *Arch. Intern. Med.*, [S.I.], n. 163, p. 1296-1304, 2003.

SMOUT, J.; DYKER, A.; CLEANTHIS, M.; FORD, G.; KESTEVEN, P.; STANSBY, G. Platelet function following acute cerebral ischemia. *Angiology.*, [S.I.], v. 60, n. 3, p. 362-369, 2009.

SOLER, E.P.; RUIZ, V.C. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart. Diseases: Similarities and Differences. *Current Cardiology Reviews*, [S.I.], v. 6, p. 138-149, 2010.

SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. Inhibition of Selective Pharmacological Distinct Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Biochem Pharmacol.*, [S.I.], v. 51, p. 383-394, 1996.

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.*, [S.I.], v. 63, n. 4, p. 381-389, 1988.

SNIDER, B.J.; DU, C.; WEI, L.; CHOI, D.W. Cycloheximide reduces infarct volume when administered up to 6 h after mild focal ischemia in rats. *Brain Res.*, [S.I.], v. 917, n. 2, p. 147-157, 2001.

SNYDER, S.H.; BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.*, [S.I.], v. 266, p. 68-71, 1992.

SUN, L.; ZHOU, W.; MUELLER, C.; SOMMER, C.; HEILAND, S.; BAUER, A.T.; MARTI, H.H.; VELTKAMP, R. Oxygen therapy reduces secondary hemorrhage after thrombolysis in thromboembolic cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*, [S.I.], v. 30, n. 9, p. 1651-1660, 2010.

SUN, M.K.; ALKON, D.L. Synergistic effects of chronic bryostatin-1 and alpha-tocopherol on spatial learning and memory in rats. *Eur J Pharmacol.*, [S.I.], v. 584, n. 2, p. 328-337, 2008.

SUNIL, A.G.; KESAVANARAYANANA, K.S; KALAIVANIA, P.; SATHIYAA, S.; RANJUA, V.; JYOTHI PRIYAA, R.; PRAMILAA, SOLOMON PAULB, F.D.; VENKHATESHA, J.; SARAVANA BABUA, C. Total oligomeric flavonoids of *Cyperus rotundus* ameliorates neurological deficits, excitotoxicity and behavioral alterations induced by cerebral ischemic–reperfusion injury in rats. *Brain Research Bulletin*, [S.I.], v. 84, p. 394-405, 2011.

TAGAMI, M.; YAMAGATA, K.; IKEDA, K.; NARA, Y.; FUJINO, H.; KUBOTA, A.; NUMANO, F.; YAMORI, Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Lab Invest.*, [S.I.], v. 78, n. 11, p. 1415-1429, 1998.

TAKINISHI, Y.; OKAZAKI, M.; OGUCHI, K. Effect of L-NAME on the synthesis of plasma fibrinogen in mice. *J Pharmacol Sci.*, [S.I.], v. 98, n. 1, p. 94-98, 2005.

THIELS, E.; KANTEREWICZ, B.I.; NORMAN, E.D.; TRZASKOS, J.M.; KLANN, E. Long-term expression in the adult hippocampus in vivo involves activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1. *J Neurosci*, [S.I.], v. 22, n. 6, p. 2054-2062, 2002.

TOGASHI, H.; KIMURA, S.; MATSUMOTO, M.; YOSHIOKA, M.; MINAMI, M.; SAITO, H. Cholinergic changes in the hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, [S.I.], v. 27, n. 3, p. 525-526, 1996.

TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radic Biol Med.*, [S.I.], v. 1, n. 43, p. 4-15, 2007.

TSAI, S.; HUNG, L.; FU, Y.; CHENG, H.; NIEN, M.; LIU, H. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats *J Vasc Surg.*, [S.I.], v. 46, p. 346-53, 2007.

UENO, M.; NAKAGAWA, T.; NAGAI, Y.; NISHI, N.; KUSAKA, T.; KANENISHI, K.; ONODERA, M.; HOSOMI, N.; HUANG, C.L.; YOKOMISE, H.; TOMIMOTO, H.; SAKAMOTO, H. The expression of CD36 in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, [S.I.], v. 37, n. 7, p. 727-737, 2011.

UNDAS, A.; SLOWIK, A.; GISSEL, M.; MANN, K.G.; BUTENAS, S. Active tissue factor and activated factor XI in patients with acute ischemic cerebrovascular events. *Eur J Clin Invest.*, [S.I.], 2011. *In press*

VATASSERY, G.T.; ADITYANJEE, A.; QUACH, H.T.; SMITH, .E.; KUSKOWSKI, M.A.; MELNYK, D. Alpha and Gamma Tocopherols in Cerebrospinal Fluid and Serum from Older, Male, Human Subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, [S.I.], v. 23, n. 3, p. 233-238, 2004.

VATASSERY, G.T.; ANGERHOFER, C.K.; PETERSON, F.J. Vitamin E concentrations in the brains and some selected peripheral tissues of selenium-deficient and vitamin E-deficient mice. *J Neurochem*, [S.I.], v. 42, n. 2, p. 554-558, 1984.

VAZIRI, N.D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v.13, n.1, p.93-9, 2004.

VELCHEVA, I.; NIKOLOVA, G. Hemorheological disturbances and cognitive function in patients with cerebrovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc.*, [S.I.], v. 39, n. 1-4, p. 397-402, 2008.

VIANNA, L.M. *Efeito da administração crônica de vitamina D3 em ratos espontaneamente hipertensos*. Tese de Doutorado apresentada à Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), p. 107, São Paulo, 1992.

VIANNA, L.M. *Manual de Fisiologia Experimental*. São Paulo: Yendis, 2008. p. 36-44.

VIANNA, L.M.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B. Treatment with vitamin D3 reduces blood pressure of SHR. *Gen Hypertension.*, [S.I.], v. 218, p. 589-591, 1992.

VICARIO, A.; DEL SUELDO, M.A.; ZILBERMAN, J.M.; CERREZO, G.H. Cognitive evolution in hypertensive patients: a six-year follow-up. *Vasc Health Risk Manag.*, [S.I.], v. 7, p. 281-285, 2011.

WANG, J.S.; CHENG, M.L; YEN, H.C.; LOU, B.S.; LIU, H.C. Vitamin E Suppresses Enhancement of Factor VIII-Dependent Thrombin Generation by Systemic Hypoxia. *Stroke*, [S.I.], v. 40, p. 656-659, 2009.

WANG, S.; KEE, N.; PRESTON, E.; WOJTOWICZ, J.M. Electrophysiological correlates of neural plasticity compensating for ischemia-induced damage in the hippocampus. *Exp Brain Res.*, [S.I.], v. 165, n. 2, p. 250-260, 2005.

WANG, Y.; QIN, Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.*, [S.I.], v. 15, n. 11, p. 1382-1402, 2010.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research.*, [S.I.], v. 38, p. 309-336, 1999.

WATSON, J.B.; ARNOLD, M.M.; HO, Y.S.; O'DELL, T.J. Age-dependent modulation of hippocampal long-term potentiation by antioxidant enzymes. *J Neurosci Res.*, [S.I.], v. 15, n. 7, p. 1564-1574, 2006.

WITZ G. Biological interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Free Radic Biol Med.*, [S.I.], v. 7, n. 3, p. 333-349, 1989.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J.*, [S.I.], v. 234, n. 2, p. 399-403, 1986.

WON, S.J.; KIM, D.Y.; GWAG, B.J. Cellular and Molecular Pathways of Ischemic Neuronal Death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, [S.I.], v. 35, n. 1, p. 67-86, 2002.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair*, [S.I.], v. 24, n. 3, p. 290-298, 2010.

XAVIER, H.T.; ABDALLA, D.S.P.; MARTINEZ, T.L.R; RAMIRES, J.A.F; GAGLIARD, A.R.T. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea *in vitro* de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq Bras Cardiol.*, [S.I.], v. 83, n. 6, p. 488-492, 2004.

XIE, Z.; SASTRY, B.R. Impairment of long-term potentiation in rats fed with vitamin E-deficient diet. *Brain Res.*, [S.I.], v. 681, n. 1, p. 193-196, 1995.

YACHUM, G.S.; FOLSOM, A.R.; KUSHI, LH. Intake of antioxidant vitamins and risk of death from stroke in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.*, [S.I.], v. 72, n. 2, p. 476-483, 2000.

YAMAGATA K. Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem Int.*, [S.I.], 2011. *In press.*

YAMAGUCHI, M.; SUGIMACHI, K.; NAKANO, K.; FUJIMOTO, M.; TAKAHASHI, M.; CHIKUGO, T.; OGAWA, H. Memory deficit accompanying cerebral neurodegeneration after stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, [S.I.], v. 60, p. 200-202, 1994.

YAMAMOTO, M.; SHIMA, T.; UOZUMI, T.; SOGABE, T.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. *Stroke*, [S.I.], v. 6, p. 977-982, 1983.

YAMORI, Y.; HORIE, R.; HANDA, H.; SATO, M.; FUKASE, M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 46-53, 1976.

YANG, T.T.; WANG, S.J. Facilitatory effect of glutamate exocytosis from rat cerebrocortical nerve terminals by alpha-tocopherol, a major vitamin E component. *Neurochem Int*, [S.I.], v. 52, n. 6, p. 979-989, 2008.

ZOU, L.B.; YAMADA, K.; TANAKA, T.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, [S.I.], v. 37, n. 3, p. 323-330, 1998.

ZS-NAGY, I.; ZS-NAGY, V.; CASOLI, T.; LUSTYIK, G. The lack of age-pigments and the alterations in intracellular monovalent electrolytes in spontaneously hypertensive, stroke-prone (SHRsp) rats as revealed by electron microscopy and X-ray microanalysis. *Adv Exp Med Biol*, [S.I.], v. 266, p. 93-106, 1989.

ZUCCA, S.; VALENZUELA, C.F. Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, [S.I.], v. 30, n. 19, p. 6776-6781, 2010.

ANEXO A - Tabelas com valores dos testes neurológicos do Labirinto, Labirinto Aquático de Morris e Contagem de Células do sub-região

Tabela 6: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto (n=24)

Parâmetros	Grupos	Período Basal	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana
Teste do Labirinto (segundos)	AT	61 \pm 24,9	53,83 \pm 35,68	66,67 \pm 26,38	53,28 \pm 40,69†	50,17 \pm 37,54*
	Controle	80,28 \pm 29,65	67,67 \pm 15,07	87,39 \pm 20,54	88,33 \pm 22,47	100,5 \pm 28,82
	L-NAME	56,22 \pm 33,28	48,61 \pm 37,85	101 \pm 29,77	119,78 \pm 0,54	118,44 \pm 9,41
	AT + L-NAME	66,67 \pm 26,38	53,06 \pm 36,56	92,06 \pm 24,68	116,56 \pm 8,44	88,94 \pm 16,60§

Legenda: AT = Alfa-tocoferol

†p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME e ao grupo AT+L-NAME

* p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle e ao grupo L-NAME

§ p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

Tabela 7: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos no Teste do Labirinto Aquático de Morris (n=24)

Parâmetros	Grupos	Período Basal	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana
Teste do Labirinto (segundos)	AT	38,20 \pm 13,80	25,24 \pm 8,88	23,11 \pm 11,34*	15,44 \pm 3,01*	17,22 \pm 4,55*
	Controle	47,19 \pm 38,12	26,42 \pm 17,30	35,56 \pm 17,28	35,67 \pm 11,53	30,78 \pm 10,54
	L-NAME	34,84 \pm 29,38	36,58 \pm 26,17	58,58 \pm 16,39	40,75 \pm 8,43	43,50 \pm 9,23
	AT + L-NAME	59,58 \pm 10,97	26,24 \pm 13,49	24,33 \pm 9,65#	23 \pm 13,12	17,5 \pm 5,07#

Legenda: AT = Alfa-tocoferol

*p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle e ao grupo L-NAME

#p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

Tabela 8: Representa a média \pm DP na comparação entre grupos na contagem de células das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo (n=24)

Sub-Regiões	CA1	CA2	CA3
Alfa-Tocoferol	512,67 \pm 15,28* [#]	170,67 \pm 48,54*	276 \pm 20,42* [#] ^α
Controle	392 \pm 87,50	127,33 \pm 19,6	179,33 \pm 22,5*
L-NAME	330 \pm 54,15	123,67 \pm 16,01	144 \pm 17,78
AT+L-NAME	452 \pm 78,94*	146 \pm 14,11	205 \pm 13,23*

*p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo L-NAME

[#]p<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Controle

^αp<0,05 considerado significativo quando comparado ao Grupo Alfa-tocoferol+L-NAME