

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

Willian Link Papalia

**O PAPEL PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
MODULAÇÃO NEUROVASCULAR E OS EFEITOS DA TROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE CONVULSÕES PÓS-TRAUMÁTICAS**

Santa Maria, RS, Brasil

2021

Willian Link Papalia

**O PAPEL PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
MODULAÇÃO NEUROVASCULAR E OS EFEITOS DA TROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE CONVULSÕES PÓS-TRAUMÁTICAS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Fighera

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2021

Willian Link Papalia

**O PAPEL PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
MODULAÇÃO NEUROVASCULAR E OS EFEITOS DA TROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE CONVULSÕES PÓS-TRAUMÁTICAS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 30 de Agosto de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA:



Michele Rechia Figuera, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Maria Rosa Chitolina, Dr^a. (UFSM)



Leonardo Magno Rambo, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS, Brasil

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, amigos, colegas, professores e familiares.

Agradeço aos amigos que incentivaram e apoiaram a ingressar na pós graduação.

Agradeço os colegas e amigos que vieram do Bioex, pela parceria que iniciou desde o grupo de estudo para ingressar no laboratório até os dias atuais, contribuindo no crescimento profissional e pessoal durante esse período.

Agradeço aos professores que me permitiram desenvolver este projeto e contribuíram com suas orientações teóricas e práticas possibilitando atingir da melhor forma os objetivos traçados.

Agradeço a minha namorada por todo amor, carinho, compreensão e parceria que fizeram todo esse processo ser mais leve e feliz. Tu me dás inspiração todos os dias, tenho muito orgulho de ter alguém como você ao meu lado.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus familiares por me fornecerem todo apoio para que mesmo em momentos difíceis tive se um suporte para segurar e continuar nesse trajeto.

RESUMO

O PAPEL PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MODULAÇÃO NEUROVASCULAR E OS EFEITOS DA TROMBINA NO DESENVOLVIMENTO DE CONVULSÕES PÓS-TRAUMÁTICAS

Autor: Willian Link Papalia

Orientadora: Michele Rechia Fighera

Co-orientador: Luiz Fernando Freire Royes

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é considerado um problema de saúde pública mundial devido a sua grande incidência e altos gastos públicos. Embora a fisiopatologia do TCE seja multifatorial, a ocorrência de alterações na coagulação está fortemente associada a piores prognósticos clínicos. O dano vascular induzido pelo TCE altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), causando o extravasamento de proteases séricas, como a trombina, para o parênquima cerebral. No cérebro, a presença dessa protease promove a ativação de vias pró-inflamatórias e da excitabilidade neuronal através dos receptores PAR-1, o que pode favorecer o aparecimento de crises epilépticas pós-traumáticas. Uma vez que o exercício pode influenciar positivamente o microambiente extracelular e pode promover processos de reparo neural, é importante elucidar o envolvimento do exercício físico na proteção contra o desenvolvimento de crises epilépticas após o TCE e sua relação com o sistema neurovascular. Dessa forma, este trabalho apresenta em um primeiro momento, um artigo de revisão a respeito dos efeitos do exercício físico no sistema neurovascular diminuído a permeabilidade da BHE após TCE. Além disso, em um segundo momento, foi investigado o efeito do TCE grave induzido por percussão de fluido em ratos Wistar, os quais foram submetidos a análise eletroencefalográfica (EEG) via rádio telemetria e posteriores análises bioquímicas. Os animais do grupo TCE apresentaram um aumento significativo do número de polipontas/pontas e na frequência das ondas nos registros eletroencefalográficos, assim como, uma redução na latência para o aparecimento da primeira crise e aumento no tempo médio das crises. Em relação às análises bioquímicas, foi observado um aumento na expressão de trombina e PAR-1 no hipocampo dos animais 6 horas após o TCE, assim como, nos marcadores inflamatórios (IL-1 β e TNF- α). Além disso, o TCE induziu um aumento na expressão das proteínas p/t-AKT, p/t-P70, ERK 1/2 e GFAP. Adicionalmente, os animais que

foram submetidos ao TCE apresentaram uma redução na expressão da Na⁺,K⁺-ATPase alfa 1 (NKA). Considerando os dados apresentados, podemos sugerir que a ativação das vias inflamatórias e da trombina aumentaram a excitabilidade cerebral dos animais, contribuindo para o desenvolvimento das crises convulsivas.

Palavras-chave: Epilepsia; TCE; Trombina; PAR-1; EEG; inflamação, crises convulsivas.

ABSTRACT

THE ROLE OF THROMBINE IN THE DEVELOPMENT OF POST-TRAUMATIC EPILEPTIC SEIZURES

Author: Willian Link Papalia

Advisor: **Michele Rechia Figuera**

Co-advisor: **Luiz Fernando Freire Royes**

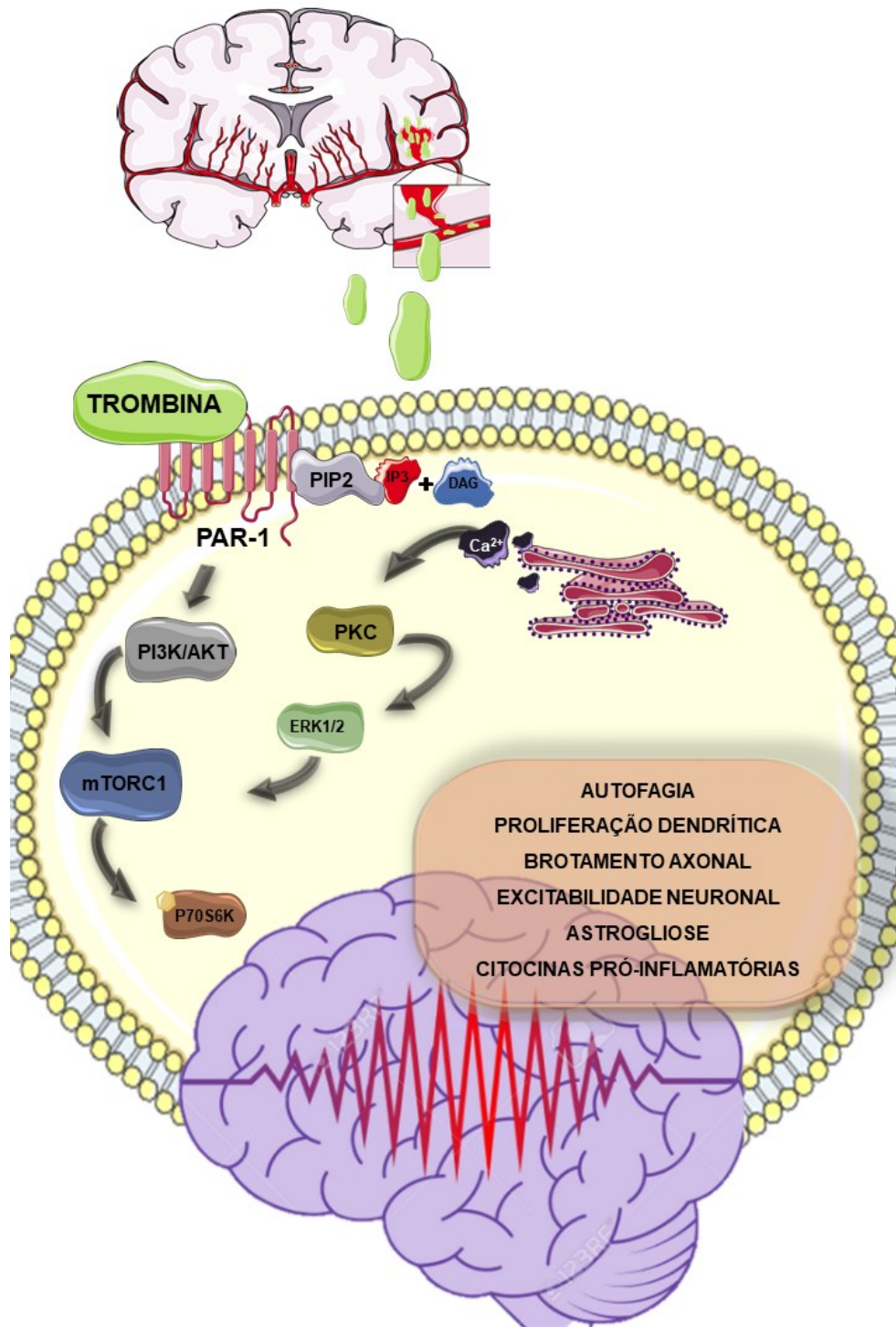
Traumatic brain injury (TBI) is considered a worldwide public health problem due to its high incidence and high public costs. Although the pathophysiology of TBI is multifaceted, the occurrence of coagulopathy is strongly associated with poor outcomes. Changes in the neurovascular tissue after trauma, increase the permeability of the blood-brain barrier (BBB), allowing the passage of proteases from the circulatory system, such as thrombin, to the brain parenchyma. In the brain, the presence of this protease promotes the activation of pro-inflammatory pathways and neuronal excitability through PAR-1 receptors, which may facilitate the appearance of post-traumatic seizures. In this sense, it is important to elucidate the exercise of physical exercise in protection against the development of post traumatic epilepsy and its relationship with the neurovascular system. Since exercise can positively influence the extracellular microenvironment and may promote neural repair processes, it is important to elucidate the involvement of physical activity in protecting against the development of epileptic seizures after TBI and its relationship with the neurovascular system. Along these lines, this paper presents a literature review regarding the effects of physical exercise on the neurovascular system after TBI. Furthermore, the effect of severe TBI induced by fluid percussion injury in Wistar rats was investigated, which were analyzed through an electroencephalographic (EEG) analysis via radio telemetry and subsequent biochemical analyses. The animals in the TBI group reinforced a significant increase in the number of spikes and in the frequency of waves in the electroencephalographic recordings, as well as decreasing the latency for the onset of the first crisis and increasing the mean duration of the seizures. Regarding biochemical analysis, an increase in thrombin and PAR-1 expression was observed in the hippocampus of animals 6 hours after TBI, as well as an increase in inflammatory markers, such as IL-1 β and TNF- α . In addition, TBI induced an increase in protein expression p / t-AKT, p / t-P70, ERK 1/2 and GFAP. Additionally, animals that were discovered by TBI

dissipated a reduction in the expression of Na⁺, K⁺-ATPase (NKA). Activation of inflammatory pathways and thrombin increased the animals brain excitability, contributing to the development of seizures.

Keywords: Epilepsy; TBI; Thrombin; PAR-1; EEG; inflammation, seizures

GRAPHICAL ABSTRACT

AUTOR: Willian Link Papalia



LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Escala de coma de Glasgow	18
Tabela 2 – Escala de gravidade da lesão em modelos experimentais	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
BHE	Barreira Hematoencefálica
CDC	Center for Disease Control
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ECG	Escala de Coma de Glasgow
EEG	Eletroencefalograma
EPT	Epilepsia pós traumática
EUA	Estados Unidos da América
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GFAP	Proteína fibrilar ácida da glia
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IP3	Inositol trifosfato
LPF	Lesão por Percussão de Fluido
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
PAR-1	Receptor ativado por protease 1
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Traumatismo Crânio-encefálico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	17
2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO.....	17
2.1.1 Definição e dados epidemiológicos.....	17
2.1.2 Classificações e fases do TCE.....	18
2.1.2.1 <i>Classificação clinica</i>	18
2.1.2.2 <i>Classificação em modelos experimentais</i>	19
2.1.2.3 <i>Fases do TCE</i>	20
2.1.3 Disfunções pós-traumáticas.....	21
2.1.3.1 <i>Dano vascular e TCE</i>	21
2.2 EPILEPSIA.....	22
2.2.1 Definição e dados epidemiológicos.....	22
2.2.2 Classificação das epilepsias e das crises.....	22
2.2.2.1 <i>Tipos de crises</i>	22
2.2.2.2 <i>Classificação etiológica</i>	24
2.3 EPILEPSIA PÓS-TRAUMÁTICA.....	26
2.3.1 Modelos experimentais de epilepsia pós-traumática.....	27
2.3.1.1 <i>Modelo de percução de fluidos</i>	28
2.3.1.2 <i>Modelo de impacto cortical controlado</i>	29
2.3.1.3 <i>Modelo de penetração</i>	29
2.4 DISFUNÇÕES NEUROVASCULARES E CRISES EPILÉPTICAS.....	30
2.4.1 Trombina.....	31
2.4.2 Inflamação e crises epilépticas.....	32
2.5 EXERCÍCIO FÍSICO	33

3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
CAPÍTULO I	36
4. MANUSCRITO.....	36
CAPÍTULO II.....	59
5. PROTOCOLO DE TCE EXPERIMENTAL.....	59
5.1. INTRODUÇÃO.....	59
5.2.1 Delineamento experimental.....	60
5.2.2 Procedimento cirúrgico.....	61
5.2.3 Análise eletroencefalográfica	62
5.2.4 Western blot.....	62
5.2.5 Análise estatística	63
5.3 RESULTADOS	64
5.4 CONCLUSÃO PARCIAL.....	71
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO.....	74
8. PERSPECTIVA	75
9. REFERENCIAS	76

APRESENTAÇÃO

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

Na sequência será descrito o REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO utilizado para o desenvolvimento dessa dissertação.

No item seguinte, será descrito o OBJETIVO GERAL deste trabalho e na sequência, será dividido os objetivos específicos em CAPÍTULO I e II.

No item CAPÍTULO I terá o **ARTIGO CIENTÍFICO** (artigo de revisão), onde será apresentada a revisão bibliográfica da literatura sobre traumatismo cranioencefálico, trombina e exercício físico. As Referências Bibliográficas encontram-se no respectivo manuscrito e representam uma parte da revisão literária desta dissertação.

No item CAPÍTULO II, será apresentado uma INTRODUÇÃO, os MATERIAIS E MÉTODOS dos procedimentos e técnicas utilizados no protocolo de TCE experimental e os RESULTADOS obtidos.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO** da dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico e dos resultados obtidos do modelo experimental de TCE contidos no final deste trabalho.

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

1. INTRODUÇÃO

A incidência anual de TCE é estimada em 50 milhões de casos em todo o mundo, assim, aproximadamente metade da população global terá um episódio de TCE em sua vida (KHELLAF et al., 2019). Anualmente, o TCE custa à economia global cerca de 400 bilhões de dólares, representando 0,5% do produto mundial bruto (DEWAN et al., 2018; LO et al., 2021). Em alguns países europeus, é a causa mais comum de morte e invalidez em pessoas com menos de 40 anos (MAAS et al., 2017). Na América Latina, os dados oficiais não são precisos, mas as estatísticas revelam que o TCE afeta predominantemente jovens adultos do sexo masculino e, muitas vezes, é o resultado de acidentes de carro ou violência (GODOY et al., 2020). Particularmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, os pacientes encontram dificuldade em encontrar assistência de saúde adequada em tempo hábil para o diagnóstico, tratamento e reabilitação dos danos causados pelo TCE, havendo maior mortalidade nesses locais (KHELLAF et al., 2019). Uma das principais consequências do TCE são as crises epiléticas, sendo uma das maiores causas de epilepsia adquirida no mundo e responsável por cerca de 20% das epilepsias adquiridas (HUNT et al., 2013). As crises epiléticas pós-traumáticas podem se desenvolver dentro das primeiras horas até semanas após a lesão e são consideradas um fator de risco para o desenvolvimento de epilepsia, podendo causar a incapacidade e até mesmo morte dos indivíduos (BETJEMANN e LOWENSTEIN, 2015; PEETS et al., 2005).

Os mecanismos envolvidos na patofisiologia das crises epiléticas pós-traumáticas ainda não são completamente entendidos, sendo necessário mais estudos sobre as alterações iniciais do TCE que podem estar desencadeando esse tipo de epilepsia. Uma das alterações iniciais causadas pelo TCE são os danos neurovasculares, que induzem ao aumento na permeabilidade da BHE e consequentemente o extravasamento de proteases do sangue para o parênquima cerebral, como a trombina (FLETCHER-SANDERSJOO et al., 2020b; MHATRE et al., 2004). A trombina é uma protease sérica pertencente à família das quimiotripsinas, e é gerada pela clivagem proteolítica de seu precursor inativo, protrombina, através da protrombinase (PLESERU e MIHAILA, 2018). Além do papel central da trombina na cascata de coagulação do sangue, onde converte fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, a trombina também regula processos celulares por meio de receptores ativados por protease (PARs), sendo o PAR-1 o receptor que está presente predominantemente nas células do SNC (LIU et al., 2008). Estudos recentes têm identificado que a presença de trombina no SNC reduz a expressão de proteínas relacionadas a manutenção da homeostase química, além

de aumentar marcadores pró-inflamatórios. Os mecanismos de ação da trombina ainda não estão completamente elucidados, mas apresentam relação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e crises epiléticas (KRENZLIN et al., 2016; PIAO, C. S. et al., 2019a). Dessa forma, se faz necessário mais estudos para investigar as alterações causadas pela presença da trombina no parênquima cerebral e se existe alguma relação com o desenvolvimento de crises epiléticas pós-traumáticas.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

2.1.1 Definição e dados epidemiológicos

Desde os princípios os problemas de saúde no mundo são causa de grande preocupação para a sociedade e para os órgãos públicos. Acidentes automobilísticos são responsáveis por gerarem grandes gastos no tratamento dos indivíduos envolvidos nestes eventos. Sendo que um evento comum em acidentes de trânsito é o traumatismo cranioencefálico (TCE), considerado uma epidemia mundial, chega a atingir cerca de 69 milhões de pessoas por ano no mundo (DEWAN et al., 2018; MENON et al., 2010). O TCE é caracterizado por uma lesão ao encéfalo causada pela aplicação de uma força mecânica externa ao corpo que seja capaz de induzir o choque do encéfalo com a parede craniana (MENON et al., 2010). As alterações causadas pelo TCE levam os indivíduos a incapacidades temporárias ou permanentes. Além disso, distúrbios emocionais e comportamentais também são causas frequentes que podem comprometer a vida social e econômica dessas pessoas.

De acordo com os dados epidemiológicos do Center for Disease Control (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA) são gastos aproximadamente 76 bilhões de dólares por ano com o tratamento de pessoas que sofrem TCE, números que vem aumentando anualmente (BLENNOW et al., 2016; FAUL e CORONADO, 2015).

No Brasil, antes de 2012, havia uma estimativa de 500 casos por 100.000 habitantes, resultando em um custo superior a 250 milhões de dólares e 998.994 internações no Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo um custo médio de US \$ 239,91 para cada internação (DATASUS) (CARTERI e SILVA, 2021).

Houve uma média de 131.014,83 internações hospitalares por ano devido a TCE de 2008 a 2019 no Brasil. A incidência foi de 65,54 por 100.000 habitantes no mesmo período. Em comparação com os resultados do último estudo, utilizando a mesma base de dados para avaliação dos dados de 2008 a 2012, não houve mudança na incidência, embora tenha havido aumento no número de internações hospitalares médias anuais e nas taxas de mortalidade (DE ALMEIDA et al., 2016). Considerando as estimativas globais de 200 casos por 100.000 habitantes, a incidência de TCE relatada no país pode estar subestimada. Em comparação com uma estimativa regional

robusta recente, o Brasil tem aproximadamente um décimo dos casos estimados na América do Norte, Europa e regiões da África; o mesmo estudo estimou uma incidência de 909 para a região da América Latina (CARTERI e SILVA, 2021). Estima-se que esses números sejam ainda maiores devido à falta de dados epidemiológicos mais precisos no Brasil.

Desta forma, se reforça a importância de estudos a respeito do TCE objetivando a implementação de futuras estratégias de promoção da saúde da população brasileira e mundial que visem reduzir a incidência, mortalidade e custos do traumatismo crânio-encefálico, assim como, esclarecer as alterações cerebrais em busca de otimizar os tratamentos e minimizar os danos secundários.

2.1.2 Classificações e fases do TCE

2.1.2.1 Classificação clínica

Clinicamente, o evento traumático encefálico pode ser classificado de acordo com a Escala de Coma de Glasgow (ECG), permitindo uma avaliação do estado neurológico do indivíduo na fase aguda do TCE e auxiliando no manejo clínico dos pacientes na chegada ao pronto atendimento. De acordo com a escala, podemos classificar o TCE em leve, moderado ou grave. A pontuação na escala é baseada nos sinais clínicos do paciente como abertura ocular, resposta motora e verbal. A partir da pontuação obtida na soma total dos itens a escala irá definir a gravidade da lesão, sendo que quanto maior for a pontuação obtida, 13-15, menor é a gravidade, como demonstrado na **tabela 1 (SILVERSIDES et al., 2005)**.

Escala de coma de Glasgow

Parâmetros	Resposta Observada	Escore
Abertura Ocular	Espontânea	4
	Ao estímulo verbal	3
	Ao estímulo doloroso	2
	Nenhuma	1
Resposta Verbal	Orientada	5
	Confusa	4

	Palavras inapropriadas	3
	Sons incompreensíveis	2
	Nenhuma	1
Resposta Motora	Obedece a comandos	6
	Localiza à dor	5
	Movimento de retirada	4
	Flexão anormal (decorticação)	3
	Extensão anormal (descerebração)	2
	Nenhuma	1
Trauma leve	Trauma moderado	Trauma grave
13-15	09-12	03-08

Tabela 1: Escala de Coma de Glasgow

2.1.2.2 Classificação em modelos experimentais

Entre os estudos experimentais com o TCE, existem diferentes métodos para indução da lesão cerebral, cada modelo tem suas características específicas que leva a diferentes tipos de lesão, podendo induzirem lesões focais ou difusas. Nas alterações focais, apenas uma região específica do encéfalo é atingida, enquanto nas difusas, o impacto é distribuído por mais de uma região do encéfalo (NORTJE e MENON, 2004). Dessa forma, os modelos de TCE são capazes de provocar tanto uma lesão focal, quanto difusa em um mesmo evento. Basicamente, a variabilidade dos modelos visa mimetizar ao máximo os casos clínicos de TCE para uma maior exatidão no momento de transpor os resultados experimentais para modelos clínicos (D'AMBROSIO et al., 2004)

Como existem diferentes modelos para a indução da lesão cerebral em modelos experimentais, cada modelo tem sua classificação da gravidade da lesão, podendo ser em Atmosfera (ATM) ou por aceleração em metros por segundo (m/s). Entretanto, uma unidade em comum entre os modelos de TCE é o tempo de inconsciência após o trauma, podendo assim fazer uma relação/comparação entre os modelos e a gravidade do dano causado. Na **tabela 2**, é demonstrado diferentes modelos e as suas classificações quanto a gravidade da lesão.

Parâmetros Analisados				
Modelo de lesão	Gravidade	Pressão (atm)	Tempo de Inconsciência (min)	Mortalidade
	Leve	0.9-1.5	2.0-4.0	0-5%
	Moderado	1.6-2.5	4.0-6.0	10-25%
Percussão de Fluidos	Grave	> 2.5	6.0-10	>33%
		Profundidade (mm)	Aceleração	Area de lesão
	Leve	< 1.0	<4.0	5-10%
Impacto cortical controlado	Moderado	1.0-1.5	4.0-5.0	15-25%
	Grave	> 2.0	5.0-6.0	30-40%
		Peso (g)	Altura (m)	Mortalidade
Weight drop	Leve	450g	1.0	0%
	Moderado	-	1.5	12.5%
	Grave	-	2.0	50%
Propagação de ondas		Pressão (kPa)		Mortalidade
	Leve	80-145		< 5%
	Moderado	146-220		35%
	Grave	221-290		70%

Tabela 2: Escala de gravidade da lesão em modelos experimentais.

2.1.2.3 Fases do TCE

O TCE apresenta dois principais momentos de progressão e desenvolvimento da lesão ao encéfalo. As alterações iniciais, são denominadas de dano primário, o qual é caracterizado pelo evento mecânico que gerou o dano tecidual. Este apresenta um curto espaço temporal e é incapaz de ser apenas tratado, mas pode ser prevenido ou amenizado a partir de medidas de segurança, como o uso de capacetes, “*air bags*” e sinto de segurança. O Segundo momento descrito no TCE, é chamado de dano secundário, o qual é entendido como o processo que parte do dano primário, ocorrendo entre minutos a anos após o TCE. Em relação aos mecanismos envolvidos, essa segunda fase do TCE está relacionada a múltiplos processos fisiopatológicos, como edema, desequilíbrio hidroeletrólítico, excitotoxicidade, eventos hipóxico-isquêmicos, trombose e inflamação (DA SILVA FIORIN et al., 2016; SILVER et al., 2019). O dano secundário inicia um processo de reorganização dos circuitos cerebrais, como necrose e apoptose celulares, neurogênese,

gliogênese, angiogênese, entre outros (PITKANEN et al., 2009; PITKANEN et al., 2007). Durante essa fase, os processos subjacentes ocorrem em fases distintas, embora essa distinção não seja bem delimitada. Diferente do dano primário, o dano secundário pode se desenvolver em dias, meses ou até mesmo anos após a lesão mecânica, criando assim, uma grande janela de tempo para possíveis intervenções terapêuticas, visando minimizar o desenvolvimento de outras patologias desencadeadas a partir do TCE.

2.1.3 Disfunções pós-traumáticas

Com a evolução dos sistemas de saúde e dos serviços de emergência, o número de sobreviventes após o TCE vem aumentando. Entretanto, a vida desses pacientes após o trauma, na maioria dos casos, não retorna às mesmas condições. Grande parte dos sobreviventes do TCE apresentam disfunções motoras que acabam influenciando nas suas atividades diárias, além do aparecimento de alterações neurológicas, como Alzheimer, Parkinson, depressão e epilepsia, reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos (PITKANEN e MCINTOSH, 2006; SCHWARZBOLD et al., 2014). Uma vez que cerca de 50% dos pacientes que sofrem um TCE grave vão desenvolver epilepsia pós-traumática, estudos nesse tema estão sendo cada vez mais frequentes (DEGRAUW et al., 2018; GUPTA et al., 2014; ROYES e GOMEZ-PINILLA, 2019).

2.1.3.1 Dano vascular e TCE

As alterações no sistema cerebrovascular é um dos primeiros e diretos danos causados pelo TCE, enquanto, a formação de edema, extravasamento de proteases séricas e o rompimento da BHE são consequências imediatas após a lesão. Eventos primários do TCE são o gatilho para a ativação de cascatas neuroquímicas e processos de hipoperfusão e dano tecidual (SALEHI et al., 2017). Além disso, a quimiotaxia de citocinas pro-inflamatória para o local da lesão, bem como, o aumento dos fatores angiogênicos e redução das “*tigh junctions*” contribuem para o aumento da permeabilidade da BHE (JHA et al., 2019).

Desta forma, com o dano ao tecido cerebrovascular e o aumento da permeabilidade da BHE, ocorre a passagem de proteínas de alto peso molecular, como a protrombina. Consequentemente, essa proteína será facilmente encontrada no parênquima cerebral e pode contribuir para os danos secundários do TCE e o desenvolvimento de doenças, como a epilepsia (FLETCHER-SANDERSJOO et al., 2020; MHATRE et al., 2004).

2.2 EPILEPSIA

2.2.1 Definição e dados epidemiológicos

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por uma predisposição persistente do tecido cerebral em gerar crises epiléticas (DEVINSKY et al., 2018). Já as crises epiléticas são descritas como uma alteração transitória e sincrônica no cérebro, normalmente apresentando uma atividade neuronal excessiva e descontrolada. Uma vez que estas alterações neuronais apresentam uma resposta motora é denominado uma crise convulsiva, desta forma, pode se dizer que a epilepsia é uma doença neurológica que altera o padrão da atividade neuronal podendo ou não apresentar crises convulsivas (DEVINSKY et al., 2018).

Dados epidemiológicos demonstram que cerca de 70 milhões de pessoas no mundo vivem com epilepsia e estima-se que cerca de 80% vivem em países de baixa e média renda (MEGIDDO et al., 2016; PREUX et al., 2015). No Brasil, apesar dos dados epidemiológicos serem escassos e desatualizados, no período de 1980 até 2003, foram registrados mais de 30 mil óbitos em decorrência da epilepsia, o que está de acordo com o baixo número de pessoas que recebem o diagnóstico e o tratamento (FERREIRA IDE e TABOSA E SILVA, 2009).

2.2.2 Classificação das epilepsias e das crises

2.2.2.1 Tipos de crises

Segundo a “*International League Against Epilepsy*” (ILAE), podemos classificar as crises epiléticas pela anatomia inicial do evento: em crises de início focal, início generalizado e de início desconhecido. As **crises epiléticas de início focal** são caracterizadas por apresentar uma atividade neuronal excessiva em uma região específica do encéfalo, não abrangendo outras áreas e tão pouco outro hemisfério. Por outro lado, as **crises epiléticas de início generalizado** apresentam uma alteração na atividade neuronal excessiva, originada em algum local de uma rede neuronal com rápido envolvimento de redes distribuídas bilateralmente. Já as **crises epiléticas de início desconhecido**, não apresentam ou não é identificado o início da crise (FISHER, 2017).

Para as crises focais, o grau de percepção opcionalmente pode ser incluído no tipo de crise. Percepção é uma característica potencialmente importante da crise e é suficiente para justificar seu uso como classificador de crise. Percepção preservada significa que a pessoa está consciente de si

e do ambiente durante uma crise, mesmo que imóvel. Uma crise focal perceptiva corresponde ao prévio termo “crise parcial simples”. Uma crise com percepção comprometida corresponde ao termo prévio “crise parcial complexa”. Percepção comprometida durante qualquer parte da crise torna a crise focal disperceptiva. Além disso, crises focais também são subgrupadas naquelas com sintomas e sinais motores e não motores no início da crise. Se ambos, sinais motores e não motores, estão presentes no início da crise, os sinais motores irão geralmente dominar, a menos que sintomas e sinais não motores (em geral sensoriais) sejam proeminentes (FISHER, 2017).

Crises focais perceptivas ou disperceptivas opcionalmente podem ser também caracterizadas por um dos sintomas listados de início motor ou não motor, refletindo o primeiro sinal ou sintoma mais proeminente da crise epiléptica, por exemplo, crise focal disperceptiva com automatismos (FISHER, 2017).

O tipo de crise “focal evoluindo para tônico-clônica bilateral” é um tipo especial de crise, que corresponde ao termo de 1981 “crise parcial com generalização secundária”. Início focal evoluindo para tônico-clônica bilateral reflete um padrão de propagação da crise, mais do que um tipo unitário de crise epiléptica, mas é uma apresentação tão comum e importante que a categorização separada foi continuada. O termo “evoluindo para tônico-clônica bilateral” em vez de “secundariamente generalizada” foi usado para distinguir uma crise de início focal da crise de início generalizado. O termo “bilateral” é usado para padrões de propagação e “generalizado” para crises epilépticas que envolvem circuitos bilaterais desde o início (FISHER, 2017).

Crises generalizadas são divididas em crises motoras e não motoras (ausências). Outras subdivisões são semelhantes àquelas da classificação de 1981, com a adição das crises mioclono-atônicas, comuns na epilepsia com crises mioclono-atônicas (síndrome de Doose), crises mioclono-tônico-clônicas, crises de ausências, entre outras.

A classificação de 2017 permite anexar um número limitado de qualificadores às crises de início desconhecido, a fim de melhor caracterizar a crise. Crises de início desconhecido podem ser referidas pela simples palavra “não classificadas” ou com características adicionais, incluindo motoras, não motoras, tônico-clônicas, espasmos epilépticos e parada comportamental. Um tipo de crise de início desconhecido pode posteriormente ser classificada tanto como de início focal quanto de início generalizado, mas qualquer comportamento associado (por exemplo, tônico-clônico) a uma crise previamente “não classificada” pode ainda ser aplicado. A esse respeito, o termo “início desconhecido” é um termo substituto – não da característica da crise, mas do desconhecimento.

2.2.2.2 *Classificação etiológica*

Um dos primeiros passos em situações clínicas frente a epilepsia é a identificação do tipo de crise e classificação etiológica da doença. Essa classificação, dependendo do caso, necessita do auxílio de exames de neuroimagem, como a tomografia ou a ressonância magnética. Primeiramente deve ser investigado se existem alterações estruturais que podem estar desencadeando as crises epiléticas. Além da etiologia estrutural, existem cinco outros grupos etiológicos para classificação da epilepsia: **genético, infeccioso, metabólico, e imune**, bem como um **grupo desconhecido**. Estes grupos etiológicos não apresentam uma classificação hierárquica e os pacientes podem ser classificados em mais de um grupo por exemplo.

Etiologia estrutural

A etiologia estrutural é definida por uma anormalidade visível em exames de neuroimagem estrutural, na qual quando associada a avaliações eletroencefalográficas, são capazes de inferir que as crises epiléticas são causadas por estas alterações estruturais detectadas nos exames de imagem. Estas alterações estruturais no tecido nervoso podem ser adquiridas através de um acidente vascular cerebral, alterações gênicas que levam a malformações do desenvolvimento cortical e por TCE, o qual é a maior causa de epilepsia adquirida do mundo (GAILLARD et al., 2009).

Etiologia genética

O conceito de epilepsia genética é que ela resulta diretamente de uma mutação genética conhecida ou presumida, sendo estas mutações as responsáveis pelo aparecimento das crises epiléticas. As epilepsias nas quais uma etiologia genética foi implicada são bastante diversas e, na maioria dos casos, os genes subjacentes ainda não são conhecidos (SCHEFFER et al., 2017).

Essas alterações podem ser constituídas por uma inferência genética, ou por um histórico familiar de uma doença autossômica dominante hereditária ou simplesmente por uma mutação genica, a qual o paciente apresenta uma mutação nova (FISHER, 2017)

Etiologia infecciosa

O conceito de uma etiologia infecciosa é aquela que resulta diretamente de uma infecção conhecida, na qual as convulsões são uma manifestação central da doença. Uma etiologia

infecçiosa se refere a um paciente com epilepsia, em vez de convulsões ocorrendo no cenário de infecção aguda, como meningite ou encefalite. Exemplos comuns em regiões específicas do mundo incluem neurocisticercose, tuberculose, HIV, malária cerebral, panencefalite esclerosante subaguda e infecções que causam anormalidades congênitas, como aquelas causadas pelo Zika vírus, toxoplasmose e citomegalovírus. Essas infecções, às vezes, também têm uma correspondência com a etiologia estrutural. Uma etiologia infecciosa também pode referir-se ao desenvolvimento da epilepsia após a infecção, como encefalite viral que leva ao aparecimento das convulsões após a infecção aguda.

Etiologia metabólica

Um grande número de alterações metabólicas está associada à epilepsia. O conceito de epilepsia metabólica é que ela resulta diretamente de um transtorno metabólico conhecido ou presumido, no qual as convulsões são uma manifestação central do distúrbio. As causas metabólicas referem-se a um defeito metabólico bem delineado com manifestações ou alterações bioquímicas em todo o corpo, como porfiria, uremia, aminoacidopatias ou convulsões dependentes de piridoxina.

Em muitos casos, as alterações metabólicas têm um comprometimento genético. É provável que a maioria das epilepsias metabólicas tenha uma base genética, mas algumas podem ser adquiridas, como a deficiência de folato cerebral. A identificação de causas metabólicas específicas da epilepsia é extremamente importante devido às implicações para terapias mais direcionadas e prevenção potencial de deficiência intelectual (SCHEFFER et al., 2017).

Etiologia imune

O conceito da etiologia da epilepsia imune é quando ela resulta diretamente de um distúrbio imune no qual as crises epilépticas a manifestação central desta afecção. Podem ser diagnosticadas quando há evidências de uma inflamação imune no sistema nervoso central (SCHEFFER et al., 2017). Uma variedade de epilepsias imunológicas foi recentemente reconhecida com apresentações características em adultos e crianças (VEZZANI et al., 2016). Uma etiologia imunológica pode ser conceituada onde há evidência de inflamação do sistema nervoso central autoimune mediada. O

diagnóstico dessas encefalites autoimunes está aumentando rapidamente, particularmente com maior acesso aos testes de anticorpos. Exemplos incluem encefalite anti-receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) e encefalite anti-LGI1 (LANCASTER e DALMAU, 2012). Com o surgimento dessas entidades, esse subgrupo etiológico merece uma categoria específica, principalmente dadas as implicações do tratamento com imunoterapias direcionadas (SCHEFFER et al., 2017).

Etiologia desconhecida

Nessa categoria estão os casos aonde não é possível fazer o diagnóstico específico além da semiologia eletroclínica básica dos pacientes. Desta forma não é possível identificar a causa das crises epiléticas e o diagnóstico vai depender do nível da avaliação disponível e realizada no paciente.

Desta forma, uma percentagem dos indivíduos acometidos por lesões adquiridas no tecido cerebral como TCE, poderá desenvolver epilepsia pós-traumática ao longo do tempo. Assim, admite-se que a lesão induz uma reorganização dos circuitos cerebrais que, com o tempo, transforma-se em um foco gerador de descargas epiléticas. Esse processo através do qual um cérebro previamente assintomático torna-se capaz de gerar crises epiléticas espontâneas é denominado epileptogênese (CAVALHEIRO et al., 1991).

2.3 EPILEPSIA PÓS-TRAUMÁTICA

Dentro da classificação etiológica, a EPT, se enquadra dentro das epilepsias estruturais adquiridas onde as alterações estruturais causadas pelo TCE são os principais responsáveis pelas crises epiléticas.

A EPT é descrita como a ocorrência de crises epilépticas recorrentes e espontâneas após um período latente do TCE. As crises epilépticas desenvolvidas após o TCE são classificadas de acordo com a janela de tempo em que aparecem como demonstrado na **figura 2**. **Crises precoces**, ocorrem dentro das primeiras 24 horas após o trauma. **Crises iniciais**, se desenvolvem dentro da primeira semana e as **crises tardias** são aquelas que surgem após um período latente maior que uma semana após o TCE. Toda crise desenvolvida dentro das primeiras semanas após o trauma é em decorrência da lesão e não caracterizam como epilepsia pós-traumática, mas sim como crises pós-traumáticas (ANWER et al., 2021).

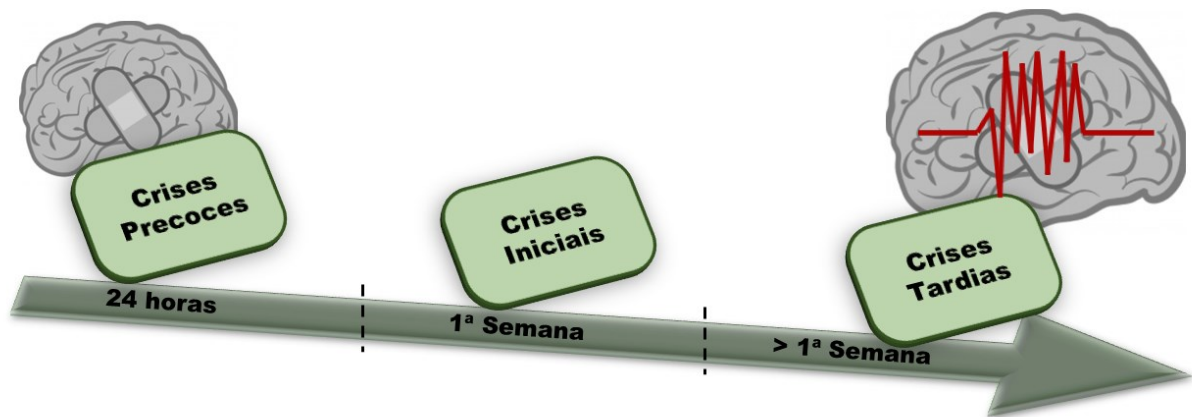


Figura 1: Classificação das crises pós-traumáticas- Figura criada pelo autor, Willian Link Papalia

2.3.1 Modelos experimentais de epilepsia pós-traumática

Modelos animais confiáveis são essenciais para elucidar a fisiopatologia da EPT sem a necessidade do uso de agentes farmacológicos para indução da epilepsia. Atualmente existem diversos modelos para induzir o desenvolvimento de EPT. Embora esses modelos forneçam evidências importantes na compreensão da EPT, nenhum deles, até o momento, abrange em sua totalidade os efeitos clínicos do TCE. Dessa forma, deve ser observado as características específicas

de cada modelo para que possa se obter as respostas equivalentes aos objetivos traçados pela pesquisa.

2.3.1.1 Modelo de percussão de fluidos

O modelo de percussão de fluidos é amplamente utilizado e eficiente no desenvolvimento de EPT. Este modelo aumenta a suscetibilidade a convulsões e reproduz a histopatologia associada a lesão cerebral traumática, incluindo lesão difusa da substância branca e uma contusão focal dentro do córtex cerebral com uma gravidade variável de leve, moderado ou grave. Além disso, o modelo induz a danos neurovasculares e axonais, formação de edema hemorrágico e défices motores e cognitivos de até 1 ano após a lesão (LIFSHITZ et al., 2016).

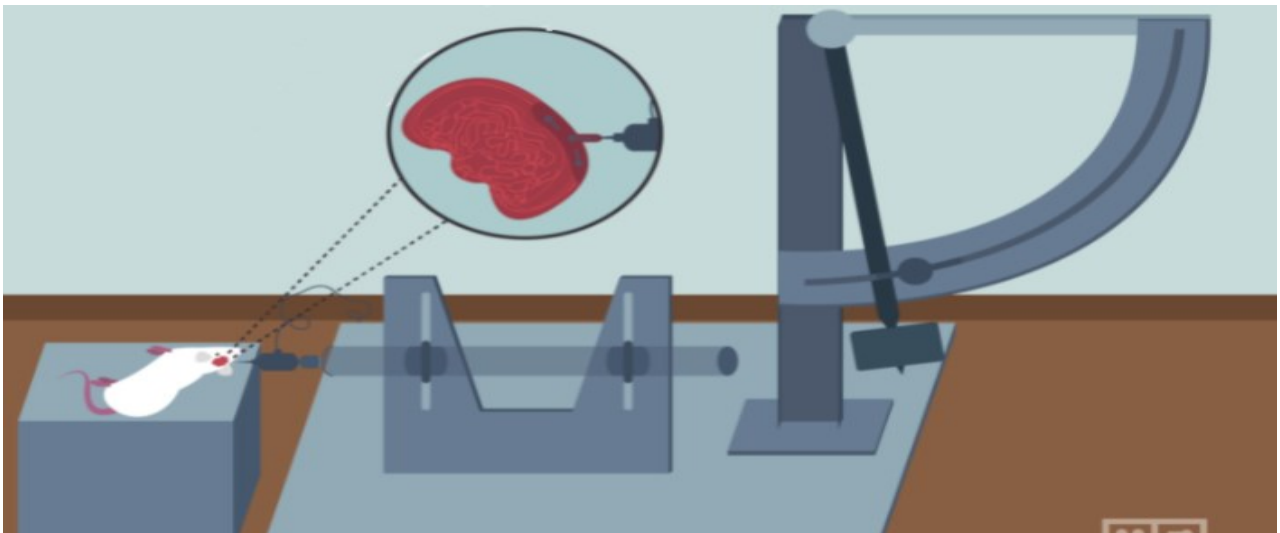


Figura 2: Figura ilustrativa do modelo de indução de lesão por percussão de fluidos (<https://conductscience.com/maze/animal-models-of-traumatic-brain-injury>).

2.3.1.2 Modelo de impacto cortical controlado

O modelo de impacto cortical controlado produz uma lesão cerebral usando um sistema pneumático ou impactador eletromagnético para comprimir o cérebro exposto para causar uma lesão cerebral. Esse modelo é capaz de induzir perda de tecido cortical, hematoma subdural agudo, lesão axonal, degeneração generalizada, não só a nível cortical, mas incluindo substância branca, hipocampo e tálamo (YANG et al., 2010). Desta forma, o modelo é capaz de induzir o desenvolvimento progressivo de hiperexcitabilidade neocortical, levando a descargas epileptiformes espontâneas sugestivas de um processo epileptogênico (HUNT et al., 2009).

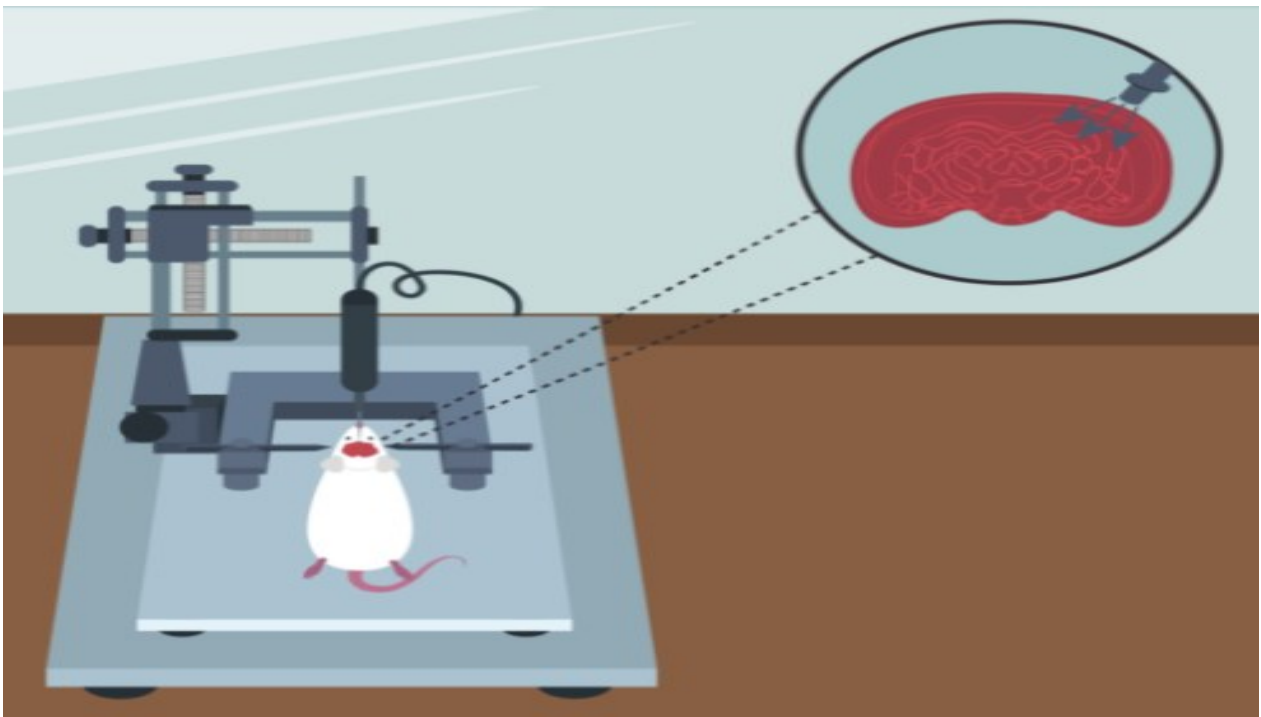


Figura 3: Figura ilustrativa do modelo de indução de lesão por impacto cortical controlado (<https://conductscience.com/maze/animal-models-of-traumatic-brain-injury>).

2.3.1.3 Modelo de penetração

O modelo de lesão cerebral por penetração mostra um risco elevado no desenvolvimento de EPT. O modelo visa mimetizar acidentes aonde ocorre a penetração de objetos, fragmentos ósseos e até mesmo acidentes com armas de fogo onde fragmentos do projétil, revestido por cobre, ficam alojados no tecido cerebral (VAKIL e SINGH, 2017). Resumidamente, o modelo consiste em uma craniotomia para exposição do tecido cerebral, onde será inserido uma broca e,

posteriormente, um fragmento de metal. Atualmente, o único modelo que apresentou alta eficácia no desenvolvimento de EPT por penetração foi utilizando fragmentos de cobre, onde mais de 95% dos animais apresentam crises convulsivas espontâneas após o TCE (KENDIRLI et al., 2014).

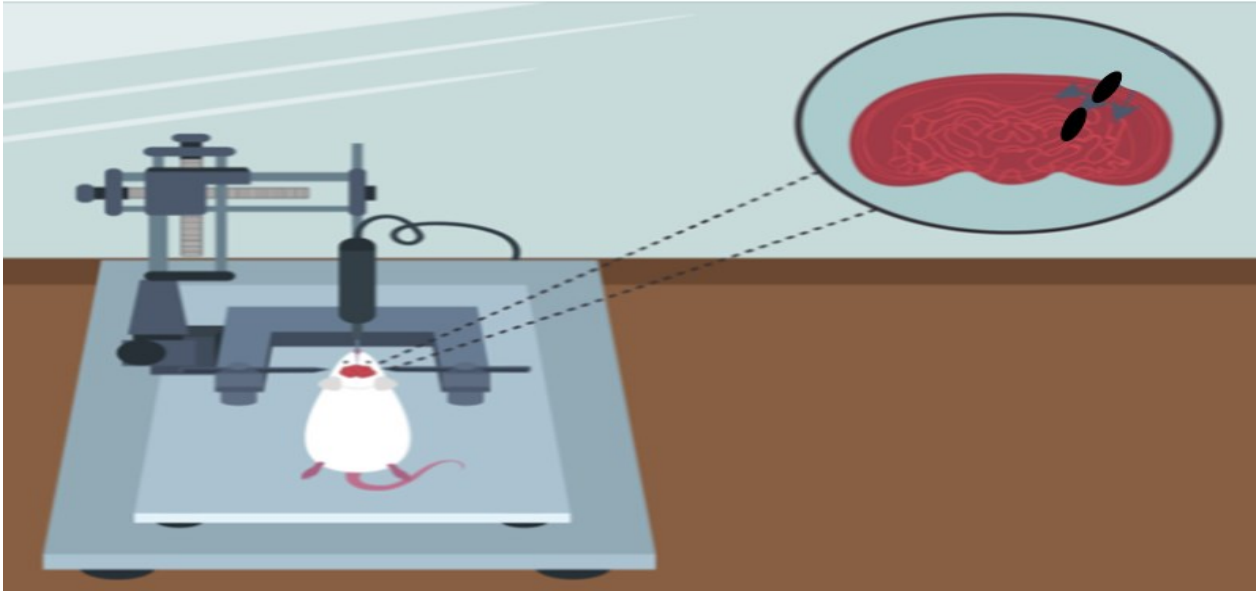


Figura 4: Figura ilustrativa do modelo de indução de lesão por objeto penetrante (<https://conductscience.com/maze/animal-models-of-traumatic-brain-injury>).

2.4 DISFUNÇÕES NEUROVASCULARES E CRISES EPILÉPTICAS

A hipótese tradicional e clássica a respeito das epilepsias enfatiza a hiperexcitabilidade da rede neuronal por um desbalanço entre a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, que eventualmente levam a crises epiléticas. Desta forma, a contribuição do sistema vascular através da interação dos vasos sanguíneos e o tecido neuronal foi pouco abordada até os dias atuais. Entretanto, estudos atuais sugerem uma causa ou contribuição do tecido vascular no desenvolvimento de fatores epileptogênicos através da ruptura da BHE, e alterações estas que podem abranger diversas etiologias de epilepsias e não apenas a EPT (BARUAH et al., 2019).

O sistema neurovascular é um dos componentes cruciais da BHE através do revestimento interno dos vasos serem repletos de células endoteliais selados por junções estreitas “*tigh juntions*”, sendo capaz de manter a homeostase iônica e controlando a passagem de proteínas e moléculas do

sistema vascular para o SNC. Alterações nesse sistema vascular podem desencadear na infiltração de proteases do sistema sanguíneo, como a protrombina, que podem ativar processos inflamatórios e aumentar a excitabilidade neuronal, facilitando o desenvolvimento de crises epiléticas.

2.4.1 Trombina

A trombina é uma protease do sangue que apresenta um papel central na cascata de coagulação, além de desempenhar um papel intracelular. A trombina é formada a partir do seu precursor inativo pro-trombina, o qual é sintetizado principalmente em células hepáticas e liberada na corrente sanguínea (PLESERU e MIHAILA, 2018). Após um dano tecidual, a molécula de pro-trombina se liga aos fatores teciduais, que estão ancorados à membrana plasmática celular e juntamente com protrombinases faz a conversão de pro-trombina (inativa) para trombina (ativa) (BUSHI et al., 2013). Dessa forma a trombina ativa desempenha um papel fundamental na cascata de coagulação aonde converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, formando os polímeros de fibrina e conseqüentemente os coágulos (WEISEL et al., 2017).

Além disso, a trombina exerce uma resposta intracelular através dos receptores de proteases ativas (PARs). Estes receptores são divididos em 4 principais isoformas identificadas numericamente por PAR-1/2/3 e 4, entretanto, apenas as isoformas 1,3 e 4 podem ser ativas por trombina. No SNC a principal isoforma encontrada é a PAR-1, a qual está presente em células neuronais, astrocitárias e microgliais (LUO et al., 2007). Estes receptores são pertencentes a família dos receptores acoplados à proteína G, onde podem ativar múltiplas vias de sinalização intracelular dependente do dímero associado à proteína G. No geral, a ativação do receptor PAR-1 em células neuronais desencadeia respostas intracelulares capazes de ativar vias pró inflamatórias, oxidativas e apoptóticas, assim como, de crescimento e proliferação neuronal (TRITSCHLER et al., 2007). Além disso, pode aumentar as concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} através da ativação de inositol 3-fosfato (IP3) no retículo endoplasmático ou indiretamente pela ativação dos receptores de glutamato NMDA (BEN SHIMON et al., 2019). Alterações que após um TCE podem potencializar os processos inflamatórios, excitotóxicos e de excitabilidade neuronal, eventos comumente vistos em processos epileptogênicos.

Dessa forma, visto que a sistema vascular desempenha um papel fundamental na homeostase do SNC e que quando em desequilíbrio pode desencadear crises epilépticas, é de fundamental importância investigar os processos pelo qual o sistema vascular pode estar relacionado com as crises epilépticas desenvolvidas após TCE.

2.4.2 Inflamação e crises epilépticas

Estudos experimentais e clínicos sugerem uma relação da neuroinflamação com o desenvolvimento das crises epilépticas assim como no processo de epileptogênese (LEE et al., 2021; RAVIZZA et al., 2011; VEZZANI e FRIEDMAN, 2011). A inflamação no sistema nervoso central (SNC) atua como a imunidade inata e é predominantemente exercida pelas células da micróglia, como fossem macrófagos residentes do SNC e liberando citocinas inflamatórias, assim como também células astrocitárias e neuronais podem exercer funções importantes no processo de defesa imune (BADIMON et al., 2020).

Os primeiros indícios clínicos da relação dos mediadores inflamatórios com o desenvolvimento de epilepsia ocorreram quando pacientes resistentes ao tratamento convencional apresentaram uma redução das crises convulsivas após o uso de anti-inflamatórios (RIIKONEN, 2004). O aumento de marcadores inflamatórios no SNC ativa receptores específicos nas células gliais que, por sua vez, podem alterar a permeabilidade da BHE e aumentam a excitabilidade neuronal, favorecendo assim o desenvolvimento das crises epilépticas.

As células astrocitárias exercem um papel fundamental na neuroinflamação sendo frequentemente vistos em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial e da maioria dos modelos animais de crises epilépticas (WETHERINGTON et al., 2008). Além da sua função estrutural, as células astrocitárias desempenham um papel de controle na manutenção da concentração intersticial de glutamato, através da captação desse neurotransmissor pelos seus transportadores controlando a excitabilidade neuronal, assim como apresentam um papel estrutural na formação da BHE (CHOI et al., 2008). Insultos ao tecido nervoso como traumas, infecções e crises epilépticas resultam em uma gliose reativa, onde alterações morfológicas e bioquímicas dessas células acabam induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , danificando a permeabilidade da BHE e contribuindo para as crises convulsivas (MUKHTAR, 2020).

2.5 EXERCÍCIO FÍSICO

A prática de exercício físico está presente na sociedade desde os primórdios, onde em épocas primitivas apresentava um caráter puramente para sobrevivência e alimentação. Já durante o período Greco-Romano, Hipócrates (460 – 370 AC) e depois Galeno (129 – 210 d.C), reconheceram a necessidade do exercício físico para o benefício da saúde e como profilaxia para atletas (SPEED e JAQUES, 2011). Em tempo atuais, Jeremiah Morris foi reconhecido como a primeira pessoa que utilizou a atividade física em epidemiologia (BLAIR et al., 2010). Hoje, evidências mostram que a atividade física regular contribui para a saúde em geral e melhora na qualidade de vida, principalmente sobre o ponto de vista cardiovascular e metabólico (PEDERSEN e SALTIN, 2015; WARBURTON et al., 2006). Entretanto, os efeitos do exercício físico não se limitam apenas aos sistemas periféricos, estudos tem mostrado efeitos benéficos também no SNC, que estão associados ao aumento da neurogênese, melhora na aprendizagem e memória. Além disso, o exercício físico profilático apresenta uma atenuação dos danos ao tecido cerebral após eventos traumáticos, como acidentes vasculares cerebrais e traumáticos cranioencefálico (RADAK, Z. et al., 2013).

Os efeitos profiláticos do exercício físico aeróbico, metabolicamente, estão relacionados ao aumento das defesas anti-oxidantes e anti-inflamatórias. A prática de exercício físico aeróbico promove aumento dos níveis de oxigênio circulante e conseqüentemente uma maior geração de espécies reativas de oxigênio, fatores que são responsáveis por induzir uma resposta adaptativa anti-oxidante e anti-inflamatória quando em níveis moderados (RADAK, Z. et al., 2013). Estudos experimentais revelam que o exercício físico aeróbico prévio é capaz de reduzir os níveis de citocinas pro-inflamatórias, infiltração de neutrófilos e a inibição de ATPases em células neuronais após TCE, bem como, reduzir a quebra da BHE (DE CASTRO et al., 2017). Desta forma, o desenvolvimento das defesas anti-onxidantes e anti-inflamatórias, induzidas pelo exercício físico, resultam em uma melhor resposta celular frente a um processo neurodegenerativo (LEEUEWENBURGH e HEINECKE, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Elucidar os mecanismos neurovasculares envolvidos no desenvolvimento das crises epiléticas precoces após um traumatismo crânio-encefálico, visando possíveis alvos para futuras intervenções terapêuticas.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I

- Realizar uma revisão a respeito dos seguintes tópicos:

1. O papel da trombina e dos receptores de trombina no SNC

2. TCE e ruptura da BHE

3. O papel da trombina na patofisiologia do TCE

4. Exercício físico e geração de trombina

4. Efeitos gerais do exercício físico nas vias neurovasculares e sua relação com a fisiopatologia induzida pelo TCE

CAPÍTULO II

- Analisar a presença de trombina ativa no hipocampo de ratos em 6 horas após o TCE.

- Avaliar a expressão dos receptores de trombina e PAR-1 no hipocampo dos animais após 6 horas da lesão.

- Verificar a ativação do complexo-1 da mTOR através da razão entre a expressão de P70S6K e p-P70S6K nos animais após 6 horas do TCE.

- Analisar os processos de excitabilidade neuronal pela expressão proteica dos transportadores de glutamato EAAT-2 nos animais que foram submetidos ao TCE após 6 horas do trauma.

- Verificar marcadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β no hipocampo de ratos submetidos ao TCE 6 horas após a lesão.

- Investigar a expressão do GFAP em amostras hipocâmpais dos animais que foram submetidos ao TCE após 6 horas.
- Avaliar as alterações eletroencefalográficas induzidas pelo TCE durante as 6 primeiras horas do trauma em ratos.

CAPÍTULO I

4. MANUSCRITO

Molecular Neurobiology

Physical exercise as a modulator of vascular pathology to improve outcomes after traumatic brain injury --Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Physical exercise as a modulator of vascular pathology to improve outcomes after traumatic brain injury				
Article Type:	Reviews				
Keywords:	blood-brain barrier; thrombin; traumatic brain injury; physical exercise; protease-activated receptor-1				
Corresponding Author:	Michele Fighera Universidade Federal de Santa Maria BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Santa Maria				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Willian Link Papalia				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Willian Link Papalia Alexandre Seixas Nascimento Krishnan Gokul Núbia Broetto Ana Flavia Furian Mauro Schneider Oliveira Luiz Fernando Freire Royes Michele Fighera				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico</td> <td>MSc. Willian Link Papalia</td> </tr> <tr> <td>coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior</td> <td>MSc. Willian Link Papalia</td> </tr> </table>	conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico	MSc. Willian Link Papalia	coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior	MSc. Willian Link Papalia
conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico	MSc. Willian Link Papalia				
coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior	MSc. Willian Link Papalia				
Abstract:	<p>Disruption of the blood-brain barrier and occurrence of coagulopathy after traumatic brain injury (TBI) has important implications for multiple secondary injury processes. Given the extent of post-traumatic changes in neuronal function, significant alterations in some targets, such as thrombin (a protease that plays a physiological role in maintaining blood coagulation) play an important role in TBI-induced pathophysiology. Despite the magnitude of thrombin in synaptic plasticity being concentration-dependent, the mechanisms underlying TBI have not been fully elucidated. The understanding of this post-injury neurovascular dysregulation is essential to establish scientific-based rehabilitative strategies. One of these strategies may be supporting physical exercise, considering its relevance in reducing damage after a TBI. However, there are caveats to consider when interpreting the effect of physical exercise on neurovascular dysregulation after TBI. To complete this picture, this review will describe how the interactions established between blood-borne factors (such as thrombin) and physical exercise alters the TBI pathophysiology.</p>				

**Physical exercise as a modulator of vascular pathology to improve
outcomes after traumatic brain injury**

Willian Link Papalia^{b,c}, Alexandre Seixas Nascimento^c, Krishnan Gokul^c, Núbia Broetto^{a,b,c}, Ana Flavia Furian^d,
Mauro Schneider Oliveira^d, Luiz Fernando Freire Royes^{b,c}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c}

^a Health Sciences Center

Department of Neuropsychiatry

Laboratory of Experimental and Clinical Neuropsychiatry

Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil

^b Center in Natural and Exact Sciences

Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil

^c Physical Education and Sports Center

Department of Sports Methods and Techniques

Exercise Biochemistry Laboratory (BIOEX)

Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil

^dHealth Sciences Center

Graduate Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil

^eDepartment of Child Health

University of Arizona College of Medicine-Phoenix

Phoenix, AZ, United States

*Corresponding author:

Dr^a. Michele Rechia Fighera

Health Sciences Center

Department of Neuropsychiatry

Federal University of Santa Maria

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Fax: 55+ 55 3220 8018

E-mail: mrfighera@yahoo.com.br

Abstract

Disruption of the blood-brain barrier and occurrence of coagulopathy after traumatic brain injury (TBI) has important implications for multiple secondary injury processes. Given the extent of post-traumatic changes in neuronal function, significant alterations in some targets, such as thrombin (a protease that plays a physiological role in maintaining blood coagulation) play an important role in TBI-induced pathophysiology. Despite the magnitude of thrombin in synaptic plasticity being concentration-dependent, the mechanisms underlying TBI have not been fully elucidated. The understanding of this post-injury neurovascular dysregulation is essential to establish scientific-based rehabilitative strategies. One of these strategies may be supporting physical exercise, considering its relevance in reducing damage after a TBI. However, there are caveats to consider when interpreting the effect of physical exercise on neurovascular dysregulation after TBI. To complete this picture, this review will describe how the interactions established between blood-borne factors (such as thrombin) and physical exercise alters the TBI pathophysiology.

Keywords: blood-brain barrier, thrombin, traumatic brain injury, physical exercise, protease-activated receptor-1.

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a public health problem responsible for high morbidity and mortality rates and caused by an external mechanical force to the brain. It is estimated that 69 million people annually suffer a TBI worldwide [1], and this pathological situation is characterized by a combination of primary damage of brain tissue and secondary injury mechanisms that develop chronically after injury [2]. Although the pathophysiology of TBI is multifaceted, the occurrence of coagulopathy is strongly associated with poor outcomes [3-5]. From a mechanistic perspective, the TBI-induced vascular damage alters blood-brain barrier (BBB) permeability and causes leakage of proteins transmitted by the blood and the extravasation of serum proteases, such as thrombin, into the brain parenchyma [6, 7].

Thrombin is a protease that belongs to the chymotrypsin family and is generated by the proteolytic cleavage of its inactive precursor prothrombin by prothrombinase [8]. Apart from the central role of thrombin in blood coagulation, thrombin regulates cellular functions via protease-activated receptors (PARs) [9]. In the central nervous system (CNS), thrombin exerts, depending on the concentration, either cytoprotective (50-100 nM) or cytotoxic effects (>500 nM) on neural cells [10]. For instance, *in vitro* studies have demonstrated that low thrombin concentrations enhance nerve growth factor synthesis and glial cell secretion, modulate neurite outgrowth, reverse process-bearing stellate astrocytes to epithelial-like astrocytes, stimulate astrocyte proliferation, and modulate endothelial cell cytoskeleton [11, 12]. In hippocampal neuron cultures, thrombin administration also protects against cell death caused by hypoglycemia, hypoxia, and growth supplement deprivation [13-15]. Nevertheless, high thrombin levels in the brain during intracerebral hemorrhage and/or BBB breakdown are known to decrease glutamate transporter expression (EAAT1 and EAAT2) and exacerbate the release of pro-inflammatory factors (e.g., TNF- α and IL-1 β) and pathological processes evidenced in neurodegenerative disorders [16, 17].

Especially in TBI, research in recent years has revealed that thrombin-PAR1 activation in the pathogenesis of hyperexcitability in neural networks may lead to post-traumatic epilepsy [16, 18]. Early thrombin-PAR1 activation is also followed by a counter-regulatory response characterized by PAR-1 degradation, which is a biological event associated with post-traumatic amnesia [19]. In the late post-TBI phase, astrocyte activation associated with increased PAR-1 and thrombin expression promotes neuronal dysfunction, neurotoxicity, and oxidative/inflammatory stress [20-22].

Regarding the role of thrombin in TBI-induced pathophysiology, it is important to note that the magnitude of thrombin in synaptic plasticity is dependent on concentration, and the exact forms of molecular signaling exerted by this protease after TBI are still not yet fully understood [18, 23]. The understanding of post-injury neurovascular dysregulation in TBI is essential to establish scientific-based rehabilitative strategies. One of these strategies may be supporting exercise training, considering its relevance in reducing damage after a TBI, limiting secondary brain damage, and promoting neuronal repair and behavioral rehabilitation [2, 24].

Homeostasis in the vascular system is the physiological process that maintains the balance between excessive bleeding and coagulation to reach normal blood circulation [25]. In this scenario, physical exercise (low to moderate

intensity) positively modifies coagulation markers and fibrinolytic response in apparently healthy populations [26, 27]. Nonetheless, acute high-intensity exercise sessions may act as a potential trigger for increased thrombotic risk due to higher venous blood flow, blood viscosity, laminar shear stress, and coagulation system activation [28]. It is evident that exercise intensity significantly influences the balance between coagulation and fibrinolysis, although methodological variations including differences in training programs, populations studied, and analytical methods may compromise a definitive conclusion on the effects of physical exercise. Despite the modulation induced by exercise training providing a unique non-pharmacological therapeutic approach to control TBI-related secondary damage [29, 30], information on the involvement of neurovascular pathways elicited by physical exercise and their relation with brain damage after TBI is scarce. Conceptually, several possibilities, or a combination of different mechanisms, must be considered. Given the above, this review will highlight the main findings in the literature on how the interactions established between (i) blood-borne factors (e.g., thrombin) and physical exercise affect the function of the gliovascular unit, which may contribute or suppress secondary brain damage and (ii) how changes in the metabolism of this protease alter TBI pathophysiology.

The role of thrombin and thrombin receptors in the CNS

Thrombin is a serine protease that converts soluble fibrinogen into insoluble fibrin strands and catalyzes many other coagulation-related reactions. In addition to being involved in blood clotting and tissue repair, this protease is also considered a multifunctional signaling molecule in different cell types through the proteolytic activation of cell surface receptors (i.e., PARs) [31]. In the CNS, there are seven (7) subtypes of thrombin receptors in the membrane coupled to the G protein activated by proteolytic protein cleavage instead of ligand binding. Three PARs (PAR-1, -3, and -4) are activated by thrombin, while PAR-2 is activated by trypsin and mast cellular tryptase [32].

Although this protease is produced in the brain immediately after a cerebral hemorrhage or BBB breakdown, clinical and experimental evidence indicates that variations in thrombin concentrations in the brain parenchyma exert cytoprotective or cytotoxic effects on neural cells. For instance, experimental data (*in vivo* and *in vitro*) have indicated that high thrombin concentrations (500 nM) within the brain parenchyma induce cell death in mixed neuronal/astrocyte cultures [33]. The activation of the PAR-1 receptor elicited by high thrombin levels also increases N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor responses in CA1 pyramidal cells [34]. Gelatinase A activation (i.e., matrix-metalloproteinases 2; MMP-2) elicited by high thrombin levels in endothelial cells degrades the extracellular matrix, causing BBB disruption [12]. However, *in vitro* studies have demonstrated that low thrombin concentrations (50-100 nM) protect primary rat astrocytes from hypoglycemia or oxidative stress-induced cell death. Intracerebral infusion of low thrombin doses (thrombin preconditioning) reduces brain injury induced by subsequent intracerebral infusion of high thrombin doses, an intracerebral hemorrhage, or cerebral ischemia [35-37]. Although the precise mechanisms of thrombin-induced brain tolerance are not known, thrombin receptor activation, up-regulation of thrombin inhibitors, and heat shock proteins in the brain may be associated with this tolerance [33, 35, 36, 38].

In homeostasis, cell proliferation and differentiation signals elicited by thrombin are regulated through mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as protein kinase-1, which is regulated by extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and ERK2) [39]. Despite being specific to each cell, signaling pathway activation such as phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C (Ca^{2+} and protein kinase C) elicited by thrombin are signaling cascades involved in the cytoskeletal rearrangements necessary for growth cone orientation, cell migration, and neuronal plasticity [10]. It is worth mentioning that the modulation of thrombin activity and its receptors in the CNS can establish new therapeutic strategies for TBI. However, the dichotomy in the effects of thrombin in brain injury reinforces the idea that further research should be carried out on the role of thrombin in TBI-induced physiopathology.

TBI and capillary leakage

Traumatic brain injuries frequently cause cerebrovascular lesions in which the capillary leakages of blood-derived proteins represent a link between vascular factors and TBI-related pathology. Following TBI, BBB dysfunction is characterized not only by the potential interruption to the tight junction's but also by increased transcytosis and altered transport properties [40]. This increased transcellular permeability of the BBB allows proteins and solutes to extravasate from the cerebral vasculature into the extracellular space within the brain, promoting edema formation, perpetuating the inflammatory response, and aggravating neuronal injury [41].

Although the most immediate cause is not the sole etiology of BBB breakdown, the second messenger cascades including inflammatory cytokines, angiogenic factors, tight junction degradation, adhesion molecules/factors promoting protein extravasation, and cytoskeletal rearrangements are some of the additional factors contributing to a leaky endothelium/vasogenic edema [42]. In the necrotic nucleus of the injury, high osmolarity drives the movement of water along this gradient and induces acute swelling and the activation of several secondary injury cascades (cytotoxic edema and vasogenic edema). The positive activation/regulation of various ion channels, including aquaporin-4, acid-sensing ion channels, Na^+/H^+ exchangers, furosemide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter, and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), allow the excessive influx of water to cause oncotic cell death in neurons, astrocytes, and glial cells 1 hour to 7 days after neuronal injury [43].

Considering that the BBB after TBI becomes permeable to high molecular weight proteins, excessive thrombin production may be due to the entry of elements in the coagulation cascade, including prothrombin, from the blood [44]. After being synthesized in the liver and released into the bloodstream [12] prothrombin activates a coagulation cascade characterized by converting the zymogen factor X to factor IXa, which converts prothrombin into thrombin to convert fibrinogen into fibrin. In the CNS, thrombin accumulation after brain injury alters cell function by cleaving and activating PARs [16, 18, 45]. The activation of PARs induces many intracellular pathways, including phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway, MAPKs, and Rho-dependent responses to control cellular responses such as cell shape, integrin activation, and platelet aggregation [46]. Thrombin is the only protease to mediate synaptic plasticity, neuroinflammation, glutamate excitotoxicity, and oxidative stress [47]. Consequently, its neuronal

accumulation modulates neuronal calcium responses, neurotoxicity, and vulnerability to excitotoxicity after neuronal injury [6, 48]. Thrombin and PAR-1 pathway is described in fig. 1.

The role of thrombin in TBI pathophysiology

After TBI, the excitotoxicity evidenced by extracellular glutamate increase is a major contributing factor in apoptosis and neuronal death [49, 50]. In this scenario, by mediating glutamate excitotoxicity [47], thrombin accumulation after BBB interruption induced by TBI modulates the neuronal responses of calcium, neurotoxicity, and vulnerability to excitotoxicity [6, 48]. In primary cortical and hippocampal astrocyte cultures, significantly down-regulated glutamate-aspartate transporter (GLAST) and suppressed glutamate uptake by astrocytes induced by thrombin exposure reinforces the involvement of this protease in glutamate efflux and astrocytic death [51-53].

In experimental TBI models (see table 1), the acute increase in thrombin expression in the hippocampus followed by reduced gene and protein expression of GLT1 (EAAT2) and GLAST (EAAT1) transporters imply that thrombin affects astrogliosis and astrocyte regulation of glutamate clearance after TBI [16]. The activation of PAR-1 elicited by high thrombin levels in the CNS also induces glutamate release from astrocytes and increases cerebral glutamate levels, suggesting the involvement of this protease in TBI-induced excitotoxicity [17, 54]. Under normal conditions, the absorption of glutamate and other anionic excitatory amino acids from the circulation is limited by the BBB; however, BBB dysfunction after TBI leads to higher intracerebral thrombin levels followed by glutamate receptor overstimulation [50, 55]. High Ca^{2+} concentrations elicited by overactivated glutamate receptors (specifically NMDARs) activate a cascade of cell degradation processes involving numerous enzymes that damage cell structures, often to the point of cell death. Glutamate excitotoxicity triggered by glutamate receptor overstimulation also contributes to intracellular oxidative stress. This complex and integrated cascade of chemical reactions occurs when excessive free radical production is caused by an insufficiency of the neutralizing antioxidant response system. Since the CNS, with its high oxygen consumption and lipid-rich content, is highly susceptible to oxidative stress, damage to the brain induced by oxidative stress has a strong potential to negatively impact normal CNS functions [56].

Although any cellular component may be a target of free radical damage, failure of important enzymes to function in neuronal metabolism induces cell excitability after TBI. After TBI, the inhibition of calcium pumps, sodium pumps, and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers with concomitant increases in levels of oxidative stress markers reinforces the idea that failure of some selected targets leads to secondary damage after neurological injury [57, 58]. Hence, intracellular Ca^{2+} induced by thrombin increases free radical generation [59], and selective targets such as ATPases are involved in the pathophysiology of TBI [2]. Moreover, it is plausible that early thrombin-induced coagulation cascade/reactive oxygen species (ROS) generation may be essential for ATPase alteration in this neurological disease. However, further research is necessary to confirm this assumption.

As previously described, TBI-induced coagulation system activation releases thrombin causing BBB breakdown and inflammatory reactions to stimulate free radicals in microglia and macrophages. These oxidative stress responses lead to nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transduction. The predominant Nrf2 is one of the

most important transcription factors that modulate cell defense. One of the most important Nrf2 target genes is the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) [60]. Low α -thrombin levels (50-100 nM) enhance manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression as a predicted response for scavenging reactive superoxide ($O_2^{\bullet-}$) in human brain endothelial cells [61]. Nevertheless, cyclooxygenase, prostaglandin E2, and cytokine production elicited by high thrombin levels after TBI can induce ROS production, and a positive feedback cycle is formed [62]. Neuroinflammation can cause acute secondary injury after TBI with increased risk for developing other neurodegenerative conditions, including Alzheimer's disease, chronic traumatic encephalopathy, and post-traumatic epilepsy [63-65].

The upregulation of cytokine and chemokine expression in different cell types (neurons, astrocytes, microglia, and endothelial cells) elicited by thrombin also contributes to chronic disease development after TBI [66]. In periphery cells, thrombin induces endothelial dysfunction, inflammation, and is related to diabetes and cardiovascular disease development [67]. From a metabolic point of view, TBI also jeopardizes the systemic physiology of organs in which subsequent dysfunctions in their metabolism attack the brain and exacerbate the general pathogenesis of TBI [2]. However, how the interaction between thrombin and the neuroendocrine system affects peripheral metabolism and how the peripheral pathophysiology elicited by thrombin production can exacerbate brain pathology after TBI is still not fully understood. Thus, it is crucial to understand how thrombin generation affects systemic and central physiology to have a thorough understanding of the pathogenesis of TBI, and a better grasp of these pathways is necessary to design effective treatments.

Physical exercise and thrombin generation

Blood homeostasis represents a complex interaction between platelets, coagulation, and fibrinolysis to maintain vascular wall integrity. Considering that thrombin a key enzyme in the coagulation cascade [68], lifestyle interventions that improve the coagulation profile involving thrombin generation may lead to important metabolic benefits. One of these interventions is physical exercise, usually associated with a significant shortening of activated partial thromboplastin time and a marked increase in factor VIII (FVIII). The increase in FVIII and blood fibrinolysis is directly related to exercise intensity and duration and the training status of individuals [69, 70]. In this sense, strenuous physical exercise has traditionally been discouraged for people with hemophilia because of the perceived risk of bleeding. The shear stress induced by vigorous exercise increases the possibility of vascular thrombotic events since the release of pro-coagulant microparticles from platelets triggers thrombin generation [71].

Long exercise sessions, such as marathon running, also activate blood clotting factors, where thrombin accumulation and reticulated fibrin followed by increased coagulation FVIII are associated with hypercoagulability [72-74], although this assumption is not universal [75]. Current knowledge of the effects of exercise on clotting factors is that exercise increases FVIII levels in healthy people, people with hemophilia B (HB), and people with mild and moderate hemophilia A (HA). These clinical data suggest the benefits of regular exercise in improving muscle function, endurance, and quality of life without increased bleeding being a problem [76]. In line with this view, clinical studies

have not found any evidence that global coagulation capacity, which is measured by thrombin generation or thromboelastographic methods, increases after exercise in severe HA or HB patients [77].

Although the exact molecular signaling pathways have not yet been defined, it is plausible that regular physical exercise improves clotting markers [78, 79]. This idea is based on increased antioxidant defenses induced by continuous physical exercise that indirectly modulate thrombin generation [80]. In this context, physical exercise of moderate intensity (40% V_{O_2max}) reduces the risk of inflammatory thrombosis evoked by vigorous exercise (80% V_{O_2max}), which is a form of preconditioning [81]. Effectively reducing inflammatory/oxidative stress elicited by previous interval aerobic training (40% V_{O_2max}) in healthy individuals before the hypoxic exercise test reinforces the notion that: a) blood is subjected to oxidative stress during extreme hypoxic exposure; b) elevated oxidative stress may contribute to activating the neutrophil/coagulation system; and c) aerobic capacity and resistance to hypoxia-induced thrombotic risk improve [82, 83]. For more information see table 2.

It is well known that physical exercise is involved in the relationship between platelet activation, blood clotting, and fibrinolysis; however, the contradictory statements elicited by different physical training protocols on coagulation processes and the relationship between changes on the periphery of the CNS must be considered.

General effects of physical exercise on neurovascular pathways and its relation with TBI-induced physiopathology

Physical exercise is essential for anyone aiming to live a healthy lifestyle. From a metabolic perspective, the importance of physical exercise on bidirectionality between the peripheral and CNS explains, at least in part, why some exercise protocols offer new opportunities to maintain health and reduce the risk of neurological diseases. Systematic reviews and meta-analyses have provided compelling evidence that physical activity promotes low-to-moderate risk reductions of dementia [84, 85]. Furthermore, physical exercise improves endogenous repair mechanisms in the brain and enhances functional recovery after experimental TBI [86, 87]. This assumption is based on significant adaptive responses to regulate physical exercise characterized by mitochondrial biogenesis, oxidant production reduction, and increased antioxidant defenses [88, 89]. The capacity to control cell metabolism, plasma membrane integrity, and synaptic plasticity explains the effective protection elicited by physical exercise on TBI-induced physiopathology.

Aerobic physical exercise has neuroprotective properties through various mechanisms, mainly by counteracting elevated oxidative stress and increasing BDNF production [90]. Physical activity enhances neuronal functions and delays or prevents cell damage and neurobehavioral disability after TBI [57, 91]. The effects of physical exercise on increasing antioxidant defenses [92], improving mitochondrial biogenesis [93], and upregulating the metabotropic BDNF are a telling demonstration of the capacity of exercise to promote metabolic homeostasis [90].

It is already a common consensus that a healthy mind lives in a healthy body, although it is not entirely clear which peripheral mechanism is caused by physical exercise. In this scenario, previous aerobic exercise training protects

against dysglycemia, impaired hepatic signaling, high levels of circulating and neuronal cytokines, the opening of the BBB, neutrophils infiltration, and Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition in the ipsilateral cortex after TBI [94]. These experimental data corroborate the idea that failure in the integrity of the BBB promotes the leakage of vascular mediators and leads to secondary damage after TBI [6, 95].

Several studies support the hypothesis that the generalized nature of neurological diseases, such as TBI, is partly due to modified lifestyles such as reduced physical activity. In this sense, the prophylactic effects induced by aerobic training via the enhancement of endogenous anti-inflammatory (IL-10), inhibition of neutrophil infiltration, attenuating BBB breakdown and pro-inflammatory (IL-1 β , TNF- α) accumulation may be a new therapeutic approach to control acute inflammation that leads to long-term cell damage and neurobehavioral disability after TBI [96]. Notably, ROS generation is a necessary and unavoidable consequence of aerobic metabolism, and the rate of ROS generation in biological tissue is closely related to oxygen consumption [97]. Nonetheless, the development of compensatory responses to oxidative stress elicited by physical training reflects the decrease in ROS generation markers, translating into BBB maintenance [98-101] (fig. 2).

Regarding the involvement of the BBB in TBI-induced physiopathology, it is important to note that mural cells (pericytes), astrocyte terminals, and intercellular junctions play a critical role in tissue integrity and vascular permeability of the BBB [102]. After TBI, membrane integrity loss leads to capillary leakage, alterations in vascular permeability, decreased cerebral blood flow, and impaired hemodynamic responses. Moreover, TBI-induced BBB disruption also facilitates angiotensin II (Ang II) access, which initiates neuronal inflammation by promoting vascular permeability via Ang II type 1 receptor (AT1-receptor) activation, increasing inflammatory cell recruitment, ROS generation, and microglial activation in autonomic areas (e.g., paraventricular nucleus) and potentiates glutamatergic toxicity [101, 103-106] (fig. 3).

Norepinephrine release during physical activity reduces neuroinflammation via microglia activation and β 2-astrocyte and lymphocyte receptors [107]. Furthermore, the significant reduction of neuronal Ang II followed by microglial activation suppression reinforces the antioxidant capacity elicited by physical exercise [101, 108]. In this scenario, it is plausible that regular physical exercise may decrease BBB permeability due to its antioxidant capacity, which, at least in part, decreases oxidative/inflammatory stress after neuronal injury. In addition, physical exercise-induced BBB maintenance may protect against serum protease extravasation and toxicity induced by neuronal thrombin accumulation after TBI, albeit data on the role of physical exercise in BBB functions after TBI is scarce [2].

Conclusion

Traumatic brain injury is a devastating disease frequently followed by significant behavioral disabilities with profound alterations in brain function [2, 24]. In this context, BBB breakdown after TBI causes the leakage of serum proteases, such as thrombin [6, 95], which in turn exacerbates the pathogenesis of this neurological injury. Although its functions are not fully understood, neuronal thrombin accumulation modulates neuronal responses of calcium, neurotoxicity, and vulnerability to excitotoxicity after TBI [6, 48]. In the long term, the upregulation of cytokine and

chemokine expression elicited by early thrombin accumulation contributes to chronic disease development after TBI [66]. However, it should be noted that thrombin magnitude in synaptic plasticity is dependent on the concentration, and the exact forms of molecular signaling exerted by this protease after TBI must be better elucidated in the literature.

Given that the brain's inability to perform metabolic homeostasis after TBI increases the consequences of a secondary brain injury, understanding post-injury neurovascular dysregulation in TBI is essential for establishing scientifically based rehabilitation strategies. One possible strategy may be physical exercise, which facilitates endogenous repair mechanisms in the brain and enhances functional recovery after experimental TBI. The exact molecular signaling pathways have not yet been defined, although improving clotting state markers and increasing antioxidant defenses induced by continuous physical exercise may indirectly modulate thrombin generation after TBI. Furthermore, the BBB maintenance elicited by physical exercise may protect against serum protease extravasation and toxicity induced by neuronal thrombin accumulation after TBI. Thus, in spite of their functions often being unreported in clinical practice, promising results of physical exercise on neurovascular pathways may positively influence treating the pathophysiology of TBI.

Declarations

Funding This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Availability of data and material Data and material pertaining to this manuscript shall be made available as per the journal's guidelines.

Code availability Not applicable.

Ethics approval Not applicable

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare no potential conflicts of interest.

Consent to publication Authors consent for the publication of the manuscript.

Consent to participate Not applicable

References

1. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, *et al.* Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2018;1-18.10.3171/2017.10.JNS17352.

2. Royes LFF, Gomez-Pinilla F. Making sense of gut feelings in the traumatic brain injury pathogenesis. *Neurosci Biobehav Rev* 2019,**102**:345-361.10.1016/j.neubiorev.2019.05.012.
3. Lindblad C, Thelin EP, Nekludov M, Frostell A, Nelson DW, Svensson M, *et al.* Assessment of Platelet Function in Traumatic Brain Injury-A Retrospective Observational Study in the Neuro-Critical Care Setting. *Front Neurol* 2018,**9**:15.10.3389/fneur.2018.00015.
4. Esnault P, Roubin J, Cardinale M, D'Aranda E, Montcriol A, Cungi PJ, *et al.* Spontaneous Hyperventilation in Severe Traumatic Brain Injury: Incidence and Association with Poor Neurological Outcome. *Neurocrit Care* 2019,**30**:405-413.10.1007/s12028-018-0639-0.
5. Albert-Weissenberger C, Hopp S, Nieswandt B, Siren AL, Kleinschnitz C, Stetter C. How is the formation of microthrombi after traumatic brain injury linked to inflammation? *J Neuroimmunol* 2019,**326**:9-13.10.1016/j.jneuroim.2018.10.011.
6. Mhatre M, Nguyen A, Kashani S, Pham T, Adesina A, Grammas P. Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment. *Neurobiol Aging* 2004,**25**:783-793.10.1016/j.neurobiolaging.2003.07.007.
7. Fletcher-Sandersjö A, Thelin EP, Maegele M, Svensson M, Bellander B-M. Time Course of Hemostatic Disruptions After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Literature. *Neurocritical Care* 2021,**34**:635-656.10.1007/s12028-020-01037-8.
8. Shannon O. The role of platelets in sepsis. *Res Pract Thromb Haemost* 2021,**5**:27-37.10.1002/rth2.12465.
9. Luo W, Wang Y, Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev* 2007,**56**:331-345.10.1016/j.brainresrev.2007.08.002.
10. Wang H, Reiser G. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biol Chem* 2003,**384**:193-202.10.1515/bc.2003.021.
11. Donovan FM, Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem* 1998,**273**:12746-12752.10.1074/jbc.273.21.12746.
12. Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem* 2003,**84**:3-9.10.1046/j.1471-4159.2003.01268.x.
13. Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* 1995,**15**:5389-5401.10.1523/jneurosci.15-07-05389.1995.
14. Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000,**97**:2264-2269.10.1073/pnas.040552897.
15. Rajput PS, Lamb JA, Fernández J, Bai J, Pereira BR, Lei IF, *et al.* Neuroprotection and vasculoprotection using genetically targeted protease-ligands. *Brain Res* 2019,**1715**:13-20.10.1016/j.brainres.2019.03.010.
16. Piao CS, Holloway AL, Hong-Routson S, Wainwright MS. Depression following traumatic brain injury in mice is associated with down-regulation of hippocampal astrocyte glutamate transporters by thrombin. 2019,**39**:58-73.10.1177/0271678x17742792.
17. Krenzlin H, Lorenz V, Danckwardt S, Kempfski O, Alessandri B. The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease. *Int J Mol Sci* 2016,**17**.10.3390/ijms17010084.
18. Ben Shimon M, Shavit-Stein E, Altman K, Pick CG, Maggio N. Thrombin as Key Mediator of Seizure Development Following Traumatic Brain Injury. *Front Pharmacol* 2019,**10**:1532.10.3389/fphar.2019.01532.
19. Itsekson-Hayosh Z, Shavit-Stein E, Last D, Goetz D, Daniels D, Bushi D, *et al.* Thrombin Activity and Thrombin Receptor in Rat Glioblastoma Model: Possible Markers and Targets for Intervention? *J Mol Neurosci* 2015,**56**:644-651.10.1007/s12031-015-0512-y.
20. Möller T, Hanisch UK, Ransom BR. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 2000,**75**:1539-1547.10.1046/j.1471-4159.2000.0751539.x.
21. Ryu J, Pyo H, Jou I, Joe E. Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Biol Chem* 2000,**275**:29955-29959.10.1074/jbc.M001220200.
22. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 2011,**2**:492-516.10.1007/s12975-011-0125-x.

23. Maggio N, Vlachos A. Synaptic plasticity at the interface of health and disease: New insights on the role of endoplasmic reticulum intracellular calcium stores. *Neuroscience* 2014,**281**:135-146.10.1016/j.neuroscience.2014.09.041.
24. Krishna G, Agrawal R, Zhuang Y, Ying Z, Paydar A, Harris NG, *et al.* 7,8-Dihydroxyflavone facilitates the action exercise to restore plasticity and functionality: Implications for early brain trauma recovery. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017,**1863**:1204-1213.10.1016/j.bbadis.2017.03.007.
25. Zadow EK, Wundersitz DWT, Hughes DL, Adams MJ, Kingsley MIC, Blacklock HA, *et al.* Coronavirus (COVID-19), Coagulation, and Exercise: Interactions That May Influence Health Outcomes. *Semin Thromb Hemost* 2020,**46**:807-814.10.1055/s-0040-1715094.
26. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Kavouras S, Stefanadis C. The associations between leisure-time physical activity and inflammatory and coagulation markers related to cardiovascular disease: the ATTICA Study. *Prev Med* 2005,**40**:432-437.10.1016/j.ypmed.2004.07.010.
27. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Kavouras S, Stefanadis C. The associations between physical activity, inflammation, and coagulation markers, in people with metabolic syndrome: the ATTICA study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005,**12**:151-158.10.1097/01.hjr.0000164690.50200.43.
28. Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY. A systematic review of the effects of acute psychological stress and physical activity on haemorrhology, coagulation, fibrinolysis and platelet reactivity: Implications for the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Thromb Res* 2007,**120**:819-847.10.1016/j.thromres.2007.01.004.
29. Ang ET, Gomez-Pinilla F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem* 2007,**14**:2564-2571
30. Motta L, Dutton E. Suspected exercise-induced seizures in a young dog. *J Small Anim Pract* 2013,**54**:213-218.10.1111/jsap.12028.
31. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2016,**62**:699-707.10.1373/clinchem.2015.248625.
32. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000,**407**:258-264.10.1038/35025229.
33. Jiang Y, Wu J, Hua Y, Keep RF, Xiang J, Hoff JT, *et al.* Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002,**22**:404-410.10.1097/00004647-200204000-00004.
34. Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci* 2000,**20**:4582-4595.10.1523/jneurosci.20-12-04582.2000.
35. Xi G, Keep RF, Hua Y, Xiang J, Hoff JT. Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning. *Stroke* 1999,**30**:1247-1255.10.1161/01.str.30.6.1247.
36. Xi G, Keep RF, Hua Y, Hoff JT. Thrombin preconditioning, heat shock proteins and thrombin-induced brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 2000,**76**:511-515.10.1007/978-3-7091-6346-7_107.
37. Masada T, Xi G, Hua Y, Keep RF. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2000,**867**:173-179.10.1016/s0006-8993(00)02302-7.
38. Hua Y, Xi G, Keep RF, Wu J, Jiang Y, Hoff JT. Plasminogen activator inhibitor-1 induction after experimental intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002,**22**:55-61.10.1097/00004647-200201000-00007.
39. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995,**80**:179-185.10.1016/0092-8674(95)90401-8.
40. Badaut J, Fukuda AM, Jullienne A, Petry KG. Aquaporin and brain diseases. *Biochim Biophys Acta* 2014,**1840**:1554-1565.10.1016/j.bbagen.2013.10.032.
41. Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009,**35**:417-426.10.1111/j.1365-2990.2008.01009.x.
42. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2019,**145**:230-246.10.1016/j.neuropharm.2018.08.004.
43. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation* 2016,**13**:264.10.1186/s12974-016-0738-9.
44. Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 1991,**6**:575-581.10.1016/0896-6273(91)90060-d.
45. Itsekson-Hayosh Z, Shavit-Stein E, Katzav A, Rubovitch V, Maggio N, Chapman J, *et al.* Minimal Traumatic Brain Injury in Mice: Protease-Activated Receptor 1 and Thrombin-Related Changes. *J Neurotrauma* 2016,**33**:1848-1854.10.1089/neu.2015.4146.

46. Jeffers A, Owens S, Koenig K, Quaid B, Pendurthi UR, Rao VM, *et al.* Thrombin down-regulates tissue factor pathway inhibitor expression in a PI3K/nuclear factor- κ B-dependent manner in human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015,**52**:674-682.10.1165/rcmb.2014-0084OC.
47. Maggio N, Itsekson Z, Dominissini D, Blatt I, Amariglio N, Rechavi G, *et al.* Thrombin regulation of synaptic plasticity: implications for physiology and pathology. *Exp Neurol* 2013,**247**:595-604.10.1016/j.expneurol.2013.02.011.
48. Smith-Swintosky VL, Zimmer S, Fenton JW, 2nd, Mattson MP. Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca²⁺ homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury. *J Neurosci* 1995,**15**:5840-5850.10.1523/jneurosci.15-08-05840.1995.
49. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg* 1990,**73**:889-900.10.3171/jns.1990.73.6.0889.
50. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2017,**34**:263-272.10.1089/neu.2015.4373.
51. Piao C, Ralay Ranaivo H, Rusie A, Wadhvani N, Koh S, Wainwright MS. Thrombin decreases expression of the glutamate transporter GLAST and inhibits glutamate uptake in primary cortical astrocytes via the Rho kinase pathway. *Exp Neurol* 2015,**273**:288-300.10.1016/j.expneurol.2015.09.009.
52. Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 2007,**55**:917-925.10.1002/glia.20513.
53. Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, López-Domínguez A, Pasantes-Morales H. Thrombin potentiates D-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K⁺ homeostasis disruption. *J Neurochem* 2009,**111**:1398-1408.10.1111/j.1471-4159.2009.06418.x.
54. Pérez-Domínguez M, Hernández-Benítez R, Peña Segura C, Pasantes-Morales H. Thrombin-facilitated efflux of D-[3H]-aspartate from cultured astrocytes and neurons under hyponatremia and chemical ischemia. *Neurochem Res* 2014,**39**:1219-1231.10.1007/s11064-014-1300-8.
55. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 2002,**35**:67-86.10.5483/bmbrep.2002.35.1.067.
56. Wang L, Wang L, Dai Z, Wu P, Shi H, Zhao S. Lack of mitochondrial ferritin aggravated neurological deficits via enhancing oxidative stress in a traumatic brain injury murine model. *Biosci Rep* 2017,**37**.10.1042/bsr20170942.
57. Silva LF, Hoffmann MS, Gerbatin Rda R, Fiorin Fda S, Dobrachinski F, Mota BC, *et al.* Treadmill exercise protects against pentylentetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2013,**30**:1278-1287.10.1089/neu.2012.2577.
58. Freire Royes LF, Cassol G. The Effects of Creatine Supplementation and Physical Exercise on Traumatic Brain Injury. *Mini Rev Med Chem* 2016,**16**:29-39.10.2174/1389557515666150722101926.
59. Moccia F, Berra-Romani R, Tanzi F. Update on vascular endothelial Ca(2+) signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World J Biol Chem* 2012,**3**:127-158.10.4331/wjbc.v3.i7.127.
60. Surai PF, Kochish, II, Fisinin VI, Kidd MT. Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update. *Antioxidants (Basel)* 2019,**8**.10.3390/antiox8070235.
61. Van Gelder CM, Doherty JM, Shatos MA. Effects of alpha-thrombin on superoxide dismutase levels in human cerebral microvascular endothelial cells. *J Trauma* 1999,**47**:885-890.10.1097/00005373-199911000-00012.
62. Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM, *et al.* Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2010,**13**:1033-1049.10.1089/ars.2009.2930.
63. Mendez MF. What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? *J Alzheimers Dis* 2017,**57**:667-681.10.3233/jad-161002.
64. Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, Zhang XL, Velisek L, Sullivan JA, *et al.* Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci Transl Med* 2012,**4**:134ra160.10.1126/scitranslmed.3003716.
65. Sharma R, Leung WL, Zamani A, O'Brien TJ, Casillas Espinosa PM, Semple BD. Neuroinflammation in Post-Traumatic Epilepsy: Pathophysiology and Tractable Therapeutic Targets. *Brain Sci* 2019,**9**.10.3390/brainsci9110318.

66. Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012,**34**:63-72.10.1007/s00281-011-0281-9.
67. Iannucci J, Renehan W, Grammas P. Thrombin, a Mediator of Coagulation, Inflammation, and Neurotoxicity at the Neurovascular Interface: Implications for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2020,**14**:762.10.3389/fnins.2020.00762.
68. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007,**5 Suppl 1**:95-101.10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x.
69. Menzel K, Hilberg T. Blood coagulation and fibrinolysis in healthy, untrained subjects: effects of different exercise intensities controlled by individual anaerobic threshold. *Eur J Appl Physiol* 2011,**111**:253-260.10.1007/s00421-010-1640-2.
70. el-Sayed MS. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med* 1996,**22**:282-298.10.2165/00007256-199622050-00002.
71. Wang K, Liao J, Yang X, Zhao M, Chen M, Yao W, *et al.* A label-free aptasensor for highly sensitive detection of ATP and thrombin based on metal-enhanced PicoGreen fluorescence. *Biosens Bioelectron* 2015,**63**:172-177.10.1016/j.bios.2014.07.022.
72. Schobersberger W, Wirleitner B, Puschendorf B, Koller A, Villiger B, Frey W, *et al.* Influence of an ultramarathon race at moderate altitude on coagulation and fibrinolysis. *Fibrinolysis* 1996,**10**:37-42.[https://doi.org/10.1016/S0268-9499\(05\)80074-8](https://doi.org/10.1016/S0268-9499(05)80074-8).
73. Bärtsch P, Haerberli A, Straub PW. Blood coagulation after long distance running: antithrombin III prevents fibrin formation. *Thromb Haemost* 1990,**63**:430-434
74. El-Sayed MS, Jones PG, Sale C. Exercise induces a change in plasma fibrinogen concentration: fact or fiction? *Thromb Res* 1999,**96**:467-472.10.1016/s0049-3848(99)00140-1.
75. Eriksson-Berg M, Egberg N, Eksborg S, Schenck-Gustafsson K. Retained fibrinolytic response and no coagulation activation after acute physical exercise in middle-aged women with previous myocardial infarction. *Thromb Res* 2002,**105**:481-486.10.1016/s0049-3848(02)00063-4.
76. Zetterberg E, Ljungkvist M, Salim M. Impact of Exercise on Hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2018,**44**:787-795.10.1055/s-0038-1675381.
77. Franchini M, Fasoli S, Gandini G, Giuffrida AC. Impact of Exercise/Sport on Well-being in Congenital Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost* 2018,**44**:796-801.10.1055/s-0038-1673628.
78. Gram AS, Bladbjerg EM, Skov J, Ploug T, Sjødin A, Rosenkilde M, *et al.* Three months of strictly controlled daily endurance exercise reduces thrombin generation and fibrinolytic risk markers in younger moderately overweight men. *Eur J Appl Physiol* 2015,**115**:1331-1338.10.1007/s00421-015-3106-z.
79. Hilberg T, Menzel K, Wehmeier UF. Endurance training modifies exercise-induced activation of blood coagulation: RCT. *Eur J Appl Physiol* 2013,**113**:1423-1430.10.1007/s00421-012-2564-9.
80. Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, *et al.* Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol* 2017,**15**:115-122.10.2174/1570161115666161104095522.
81. Wang JS, Chung Y, Chow SE. Exercise affects platelet-impaired antitumor cytotoxicity of natural killer cell. *Med Sci Sports Exerc* 2009,**41**:115-122.10.1249/MSS.0b013e3181831f27.
82. Kotwal J, Apte CV, Kotwal A, Mukherjee B, Jayaram J. High altitude: a hypercoagulable state: results of a prospective cohort study. *Thromb Res* 2007,**120**:391-397.10.1016/j.thromres.2006.09.013.
83. Chen YC, Ho CW, Tsai HH, Wang JS. Interval and continuous exercise regimens suppress neutrophil-derived microparticle formation and neutrophil-promoted thrombin generation under hypoxic stress. *Clin Sci (Lond)* 2015,**128**:425-436.10.1042/cs20140498.
84. Hamer M, Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med* 2009,**39**:3-11.10.1017/S0033291708003681.
85. Stigger F, Marcolino MAZ, Portela KM, Plentz RDM. Effects of Exercise on Inflammatory, Oxidative and Neurotrophic Biomarkers on Cognitively Impaired Individuals Diagnosed with Dementia or Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2018.10.1093/gerona/gly173.
86. Griesbach GS. Exercise after traumatic brain injury: is it a double-edged sword? *PM R* 2011,**3**:S64-72.10.1016/j.pmrj.2011.02.008.
87. Archer T, Svensson K, Alricsson M. Physical exercise ameliorates deficits induced by traumatic brain injury. *Acta Neurol Scand* 2012,**125**:293-302.10.1111/j.1600-0404.2011.01638.x.
88. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008,**44**:153-159.10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029.

89. Tofas T, Draganidis D, Deli CK. Exercise-Induced Regulation of Redox Status in Cardiovascular Diseases: The Role of Exercise Training and Detraining. 2019,**9**.10.3390/antiox9010013.
90. Gomez-Pinilla F, Hillman C. The influence of exercise on cognitive abilities. *Comprehensive Physiology* 2013,**3**:403-428
91. da Silva Fiorin F, de Oliveira Ferreira AP, Ribeiro LR, Silva LF, de Castro MR, da Silva LR, *et al.* The Impact of Previous Physical Training on Redox Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats: A Behavioral and Neurochemical Approach. *J Neurotrauma* 2016,**33**:1317-1330.10.1089/neu.2015.4068.
92. Marques-Aleixo I, Oliveira PJ, Moreira PI, Magalhaes J, Ascensao A. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog Neurobiol* 2012,**99**:149-162.10.1016/j.pneurobio.2012.08.002.
93. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2009,**41**:517-521.10.1007/s10863-009-9250-6.
94. de Castro MRT, Ferreira APO, Busanello GL, da Silva LRH, da Silveira Junior MEP, Fiorin FDS, *et al.* Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats. 2017,**595**:6023-6044.10.1113/jp273933.
95. Fletcher-Sandersjoo A, Maegele M, Bellander BM. Does Complement-Mediated Hemostatic Disturbance Occur in Traumatic Brain Injury? A Literature Review and Observational Study Protocol. *Int J Mol Sci* 2020,**21**.10.3390/ijms21051596.
96. Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LF, Magni DV, Ferreira AP, *et al.* Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotox Res* 2012,**21**:175-184.10.1007/s12640-011-9257-8.
97. Toldy A, Stadler K, Sasvari M, Jakus J, Jung KJ, Chung HY, *et al.* The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res Bull* 2005,**65**:487-493.10.1016/j.brainresbull.2005.02.028.
98. Salo DC, Donovan CM, Davies KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 1991,**11**:239-246.10.1016/0891-5849(91)90119-n.
99. Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L, Brooks GA. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol (1985)* 1993,**75**:566-572.10.1152/jappl.1993.75.2.566.
100. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001,**8**:829-838.10.2174/0929867013372896.
101. Małkiewicz MA, Szarmach A, Sabisz A, Cabała WJ, Szurawska E, Winklewski PJ. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. 2019,**16**:15.10.1186/s12974-019-1403-x.
102. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. 2016,**19**:771-783.10.1038/nn.4288.
103. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2017,**18**:419-434.10.1038/nrn.2017.48.
104. Kisler K, Nelson AR, Rege SV, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, *et al.* Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. 2017,**20**:406-416.10.1038/nn.4489.
105. Prakash R, Carmichael ST. Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 2015,**28**:556-564.10.1097/wco.0000000000000248.
106. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2010,**6**:393-403.10.1038/nrneurol.2010.74.
107. Pan YX, Gao L, Wang WZ, Zheng H, Liu D, Patel KP, *et al.* Exercise training prevents arterial baroreflex dysfunction in rats treated with central angiotensin II. *Hypertension* 2007,**49**:519-527.10.1161/01.hyp.0000256955.74461.93.
108. Buttler L, Jordão MT, Fragas MG, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC. Maintenance of Blood-Brain Barrier Integrity in Hypertension: A Novel Benefit of Exercise Training for Autonomic Control. *Front Physiol* 2017,**8**:1048.10.3389/fphys.2017.01048.

Figures Legends

Fig. 1 *Thrombin/PAR1 pathways* – Activation of PAR-1 can modulate different cell responses, including inflammation, neuronal excitability, and cell death. Thrombin/PAR-1 increases pro-inflammatory cytokine production such as TNF- α and IL-1 β via MAPK/ERK/NF κ B. It also stimulates PLC production of IP₃, leading to Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. PAR-1 activation results in Ca²⁺ influx through Src/NMDA2A and promotes excitotoxicity, ROS production, and apoptotic pathway activation. Abbreviations: ERK= extracellular signal-regulated kinases, IL= interleukin, IP₃= inositol 1,4,5 triphosphate, MAPK= mitogen-activated protein kinases, NF κ B= nuclear factor kapa - beta, NMDA= N-methyl-D-aspartate, NO= nitric oxide, PAR-1= protease-activated receptor-1, PKC-B= protein kinase C - beta, PLC= phospholipase C, ROS= reactive oxygen species, TNF- α = necrosis factor alpha.

Fig. 2 *Effects of exercise on the neurovascular pathway* – Exercise increases mitochondrial biogenesis, antioxidant enzymes, and anti-inflammatory cytokines, preventing ROS production. ROS production is related to increased BBB permeability, which can provoke toxicity and cell death. Sedentary individuals are more prone to neurochemical damage than trained individuals. Abbreviations: BBB= blood-brain barrier, CAT= catalase, IL= interleukin, ROS= reactive oxygen species, SOD= superoxide dismutase.

Fig. 3 *Protective effects of exercise on TBI* – Physical exercise (1) promotes neurochemical changes on neuronal tissue, including decreased blood-brain barrier permeability (2) that can protect cerebral parenchyma against traumatic brain injury (3) by preventing exacerbated thrombin extravasation (4) from capillary. In neuron cells, norepinephrine reduces neuroinflammation through microglia and astrocytes β 2 receptors and downregulates AT1 activation leading to decreased inflammation and ROS damage (5). Abbreviations: Ang II = angiotensin II, AT1= angiotensin II type 1 receptor, BBB= blood-brain barrier, ROS= reactive oxygen species.

Table 1 – TBI and Thrombin

Article, Year	TBI Model	Tissue	Time course of thrombin	Main Results
Piao et al., 2019	Electromagnetic impact device	Hippocampus	Thrombin increased 1-24 hours post TBI	TBI decreases glutamate transporters GLT-1 and GLAST and allows extravasation of thrombin. Thrombin activity in the hippocampus increased one day post TBI. This was prevented by administration of PAR-1 antagonist SCH79797
Shimon et al., 2019	Weight drop	Hippocampus	Thrombin increased 24 hours post mTBI-pilocarpine	mTBI was able to reduce seizure onset in the pilocarpine animal model, as well as increase the death rate in the treated animals. Thrombin activity, expression of IL1- β and TNF- α was significantly increased in the mTBI-pilocarpine treated animals
Kramer et al., 2018	Subdural injection	Serum	-	Thrombin inhibition in the subdural blood and local cerebral blockade of PAR-1 cause a tendency towards reduced lesion volume or functional recovery
Liu et al., 2014	LFP	CSF and Hippocampus	Thrombin concentration in CSF increased at 0.5h-3 hours post TBI	Systemic administration of the SFK inhibitor, PP2, immediately after moderate TBI blocks ROCK1 expression, protects hippocampal CA2/3 neurons, and improves spatial memory function
Prima, 2013	Blast-related Injury	Serum	Thrombin generation peaked in 6 hours, dropped to control levels at 1 day post-blast, and then exhibited a secondary increase at day 7 post-blast	Integrin α/β and sICAM-1 levels increased in 6 hours, 1 day and 7 days. MMP-2, MMP-8, and MMP-13 slightly rose in 1-7 days after blast injury

Abbreviations: CSF= cerebrospinal fluid, GLT-1= glutamate transporter 1, GLAST= glutamate aspartate transporter 1, IL1- β = interleukin 1- beta, LFP= lateral fluid percussion. MMP= matrix metalloproteinases, mTBI= mild traumatic brain injury, PAR-1= protease-activated receptor- 1, ROCK1= Rho-kinase 1, SFK= Src family kinases, sICAM-1= soluble intercellular cell adhesion molecule 1.

Table 2 – Thrombin and Exercise

Article, Year	Exercise type	Exercise time	Coagulation factors	Main Results
Xiang et al., 2020	Long duration, low intensity exercise	4 weeks (7 days/week: 90 min/day)	Increased secretogranin 2 levels	Protein levels were altered in blood-derived exosomes after chronic treadmill exercise. Levels of the secretagogic secretogranin 2 were markedly elevated in exercise-induced exosomes
Kecken et al., 2019	Strenuous exercise	6 days	Increased thrombin on normoxic exercise and decreased on hypoxic exercise	Normoxic exercise increased plasma peak TG through increased factor VIII (FVIII), and increased VWF and active VWF levels. After repetitive hypoxic exercise platelet aggregation potential and platelet-dependent TG decreased at high altitude
Cwikiel et al., 2017	Exhaustion exercise	Acute exercise	Increased pro-coagulant activity	Pro-coagulant activity increased during short-term strenuous exercise testing in patients with symptoms suggestive of CAD
Wu et al., 2017	High-intensity interval training	6 weeks	-	6-week HIT increased mitochondrial capacity with enhancing the citrate synthase and succinate dehydrogenase activities, heightened mitochondrial membrane potential with depressing MOB in platelets following hypoxic exercise, compared to those of MCT and CTL
Sedgwick et al., 2016	High-intensity exercise	4x3' of high-intensity rowing intervals	Increased thrombin 15 min after session of exercise	The magnitude of the post-intervention change was greater in the exercise than control condition for all thrombin generation parameters

Abbreviations: CAD: coronary artery disease, CTL= control group, HIT: high-intensity interval training, MCT= moderate-intensity continuous training, MOB= matrix oxidized burden, TG= thrombin generation, VWF= Von Willebrand factor.

Figure 1.

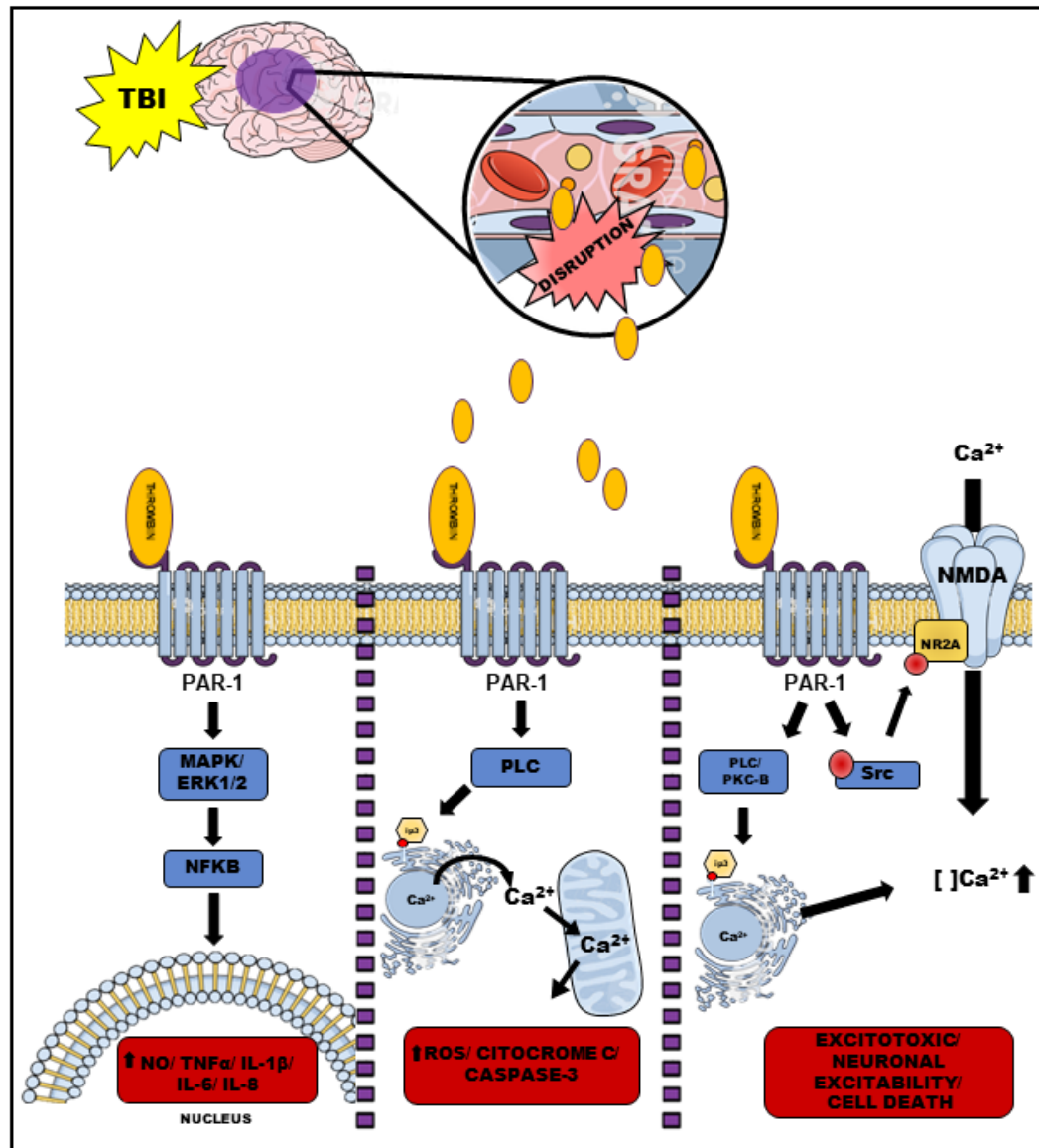


Figure 2.

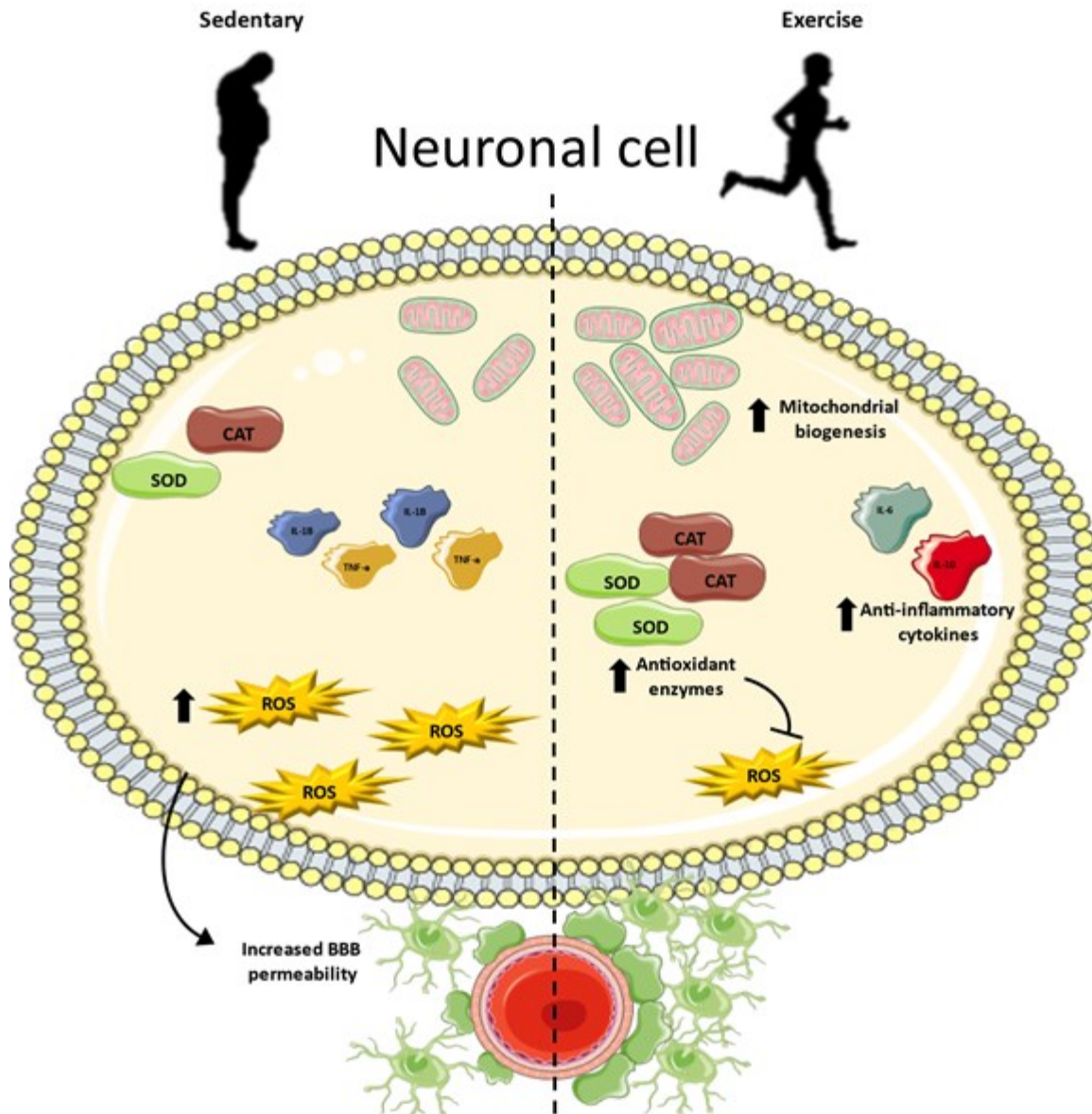
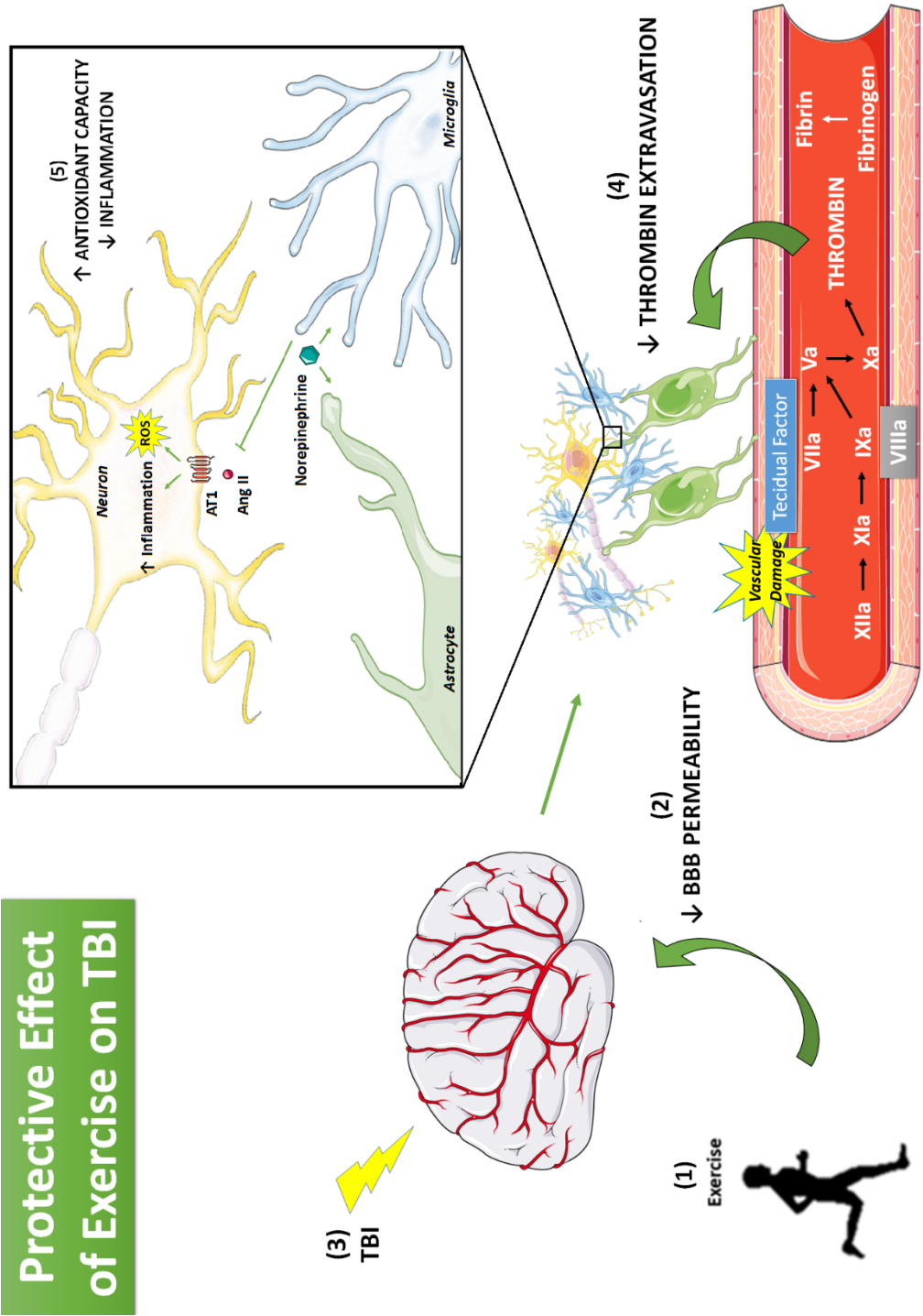


Figure 3.



CAPÍTULO II

5. PROTOCOLO DE TCE EXPERIMENTAL

O PAPEL DA TROMBINA NO DESENVOLVIMENTO DE CRISES CONVULSIVAS PÓS-TRAUMÁTICAS

5.1. INTRODUÇÃO

O traumatismo crânio-encefálico (TCE) é um dos maiores responsáveis pelo desenvolvimento de epilepsia adquirida no mundo. Entretanto, os mecanismos envolvidos na patofisiologia das crises epiléticas pós-traumáticas não estão completamente esclarecidos. Os danos neurovasculares, causados pelo TCE, induzem um aumento na permeabilidade da BHE e, conseqüentemente, o extravasamento de proteases do sangue para o parênquima cerebral (FLETCHER-SANDERSJOO et al., 2020b).

Dentre essas proteases, a trombina é um polipeptídeo sérico pertencente à família das quimotripsinas, gerada pela clivagem proteolítica de seu precursor inativo, protrombina, através da protrombinase (PLESERU e MIHAILA, 2018). Ela apresenta um papel principal na conversão de fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel na cascata de coagulação. Além disso, a trombina, através do receptor PAR-1, pode ativar vias inflamatórias e aumentar a excitabilidade neuronal de forma excessiva, favorecendo o aparecimento de crises epiléticas (BEN SHIMON et al., 2019). Nesta linha de pensamento, é plausível propor que o sistema neurovascular está relacionado com o desenvolvimento de crises epiléticas e pode ser um alvo em potencial para intervenções terapêuticas ou preventivas.

Dessa forma, avaliamos os efeitos de um modelo experimental de TCE grave no aparecimento de crises convulsivas nas primeira 6 horas, assim como, na expressão de proteínas envolvidas no sistema neurovascular e inflamatórias.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Delineamento experimental

Os experimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 2280010819, assim como, foram tomadas todas as medidas necessárias para reduzir o estresse e o número de animais utilizados no experimento. Para realização do estudo foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 350g, os quais foram mantidos com ciclo claro/escuro de 12 horas e em temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, com ração e água ad libitum. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos independentes, NAIVE, CONTROLE e TCE. Todos os animais, exceto os do grupo NAIVE, passaram pelos procedimentos cirúrgicos para implante dos eletrodos e de uma cânula para indução do TCE pelo modelo de percussão de fluídos.

Resumidamente, os animais foram anestesiados em uma câmara de anestesia com isoflurano 5%, onde foi realizado os procedimentos cirúrgicos para implante dos eletrodos e da cânula para indução do TCE. 72 horas após o procedimento cirúrgico os animais TCE e CONTROLE realizaram o registro basal do EEG. Logo após, os animais do grupo TCE foram submetidos ao trauma grave ($2.8 \pm 0.2 \text{ ATM}$). Assim que os animais retomavam a consciência, eles eram novamente levados para a realização do EEG até as 6 horas após o TCE e então eram imediatamente eutanasiados, para retirada do tecido hipocampal ipsilateral (mesmo lado da lesão) para as análises biológicas (Figura 5).



Figura 5: Mostra o procedimento cirúrgico nos animais TCE e CONTROLE. Inicialmente os animais foram submetidos a análise eletroencefalográfica para obter o registro basal. Logo após, os animais do grupo TCE foram submetidos ao trauma grave (2.8 ± 0.2 ATM). Assim que os animais retomavam a consciência, eles eram novamente levados para a realização do EEG, assim como, os animais CONTROLE, por até as 6 horas e, então eram imediatamente eutanasiados para retirada do tecido hipocampal ipsilateral. Figura criada pelo autor, William Link.

5.2.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados em uma câmara de anestesia com isoflurano 5 % e fixados em um estereotáxico e mantidos a isoflurano 2.5%, onde foi realizada uma incisão sobre o couro cabeludo e a fáscia subjacente foi removida. Após a visualização da sutura central e lambdóide, foi demarcada a região específica para a realização da craniotomia, (2 mm anteroposterior 3 mm mediolateral). Foi aplicado uma cola de cianoacrilato na base da cânula e colocada sobre o crânio no orifício criado pela craniotomia. Logo após, foi fixada a cânula com metacrilato de metila (acrílico dental) ao redor da mesma, quando finalizado o procedimento será colocado uma tampa com rosca no orifício da cânula para evitar a entrada de elementos externos. Os eletrodos para o registro eletroencefalográfico foram implantados no córtex frontal, temporal (área perilesional) e occipital (Figura 6). Os eletrodos foram fixados com metacrilato de metila na calota craniana por microparafusos específicos, que foram fixados e soldados em um micro conector para o sistema de EEG. Todo processo foi realizado com o animal anestesiado via máscara de anestesia com isoflurano aproximadamente 2,5%, controlado por um sistema de anestesia inalatória desenvolvido no laboratório.

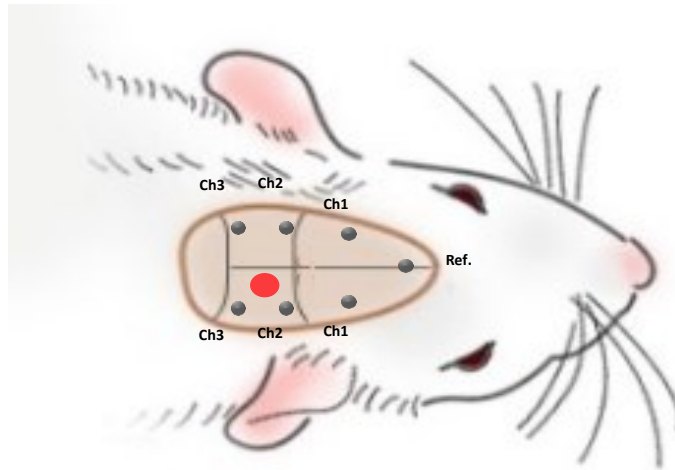


Figura 6: Mostra o local onde foram inseridos os eletrodos para o registro eletroencefalográfico no córtex frontal, temporal (área perilesional) e occipital. Figura criada pelo autor, Willian Link

5.2.3 Análise eletroencefalográfica

Os registros eletroencefalográficos foram realizados através de rádio-telemetria DSI Instrument. Originalmente para utilização do sistema, realizamos uma cirurgia abdominal para implante do transmissor e os fios passam subcutaneamente pelo dorso até o encéfalo. Neste trabalho, os transmissores ficaram acoplados externamente aos animais em uma mochila e o conector fêmea ficava exposto para a conexão com os fios do transmissor. Os registros foram captados pelo software ART Dataquest e, posteriormente analisados no software NeuroScore. Para identificação das “*pontas e polipontas*” foram adotados alguns parâmetros de acordo com (KUMAR, 2021). Resumidamente, os “*as pontas ou polipontas*” foram considerados quando o registro apresentava uma amplitude de 3x maior do que amplitude basal, duração maior do que 2s e espículas de 50-100ms dentro do evento.

5.2.4 Western blot

As amostras de hipocampo ipsilateral foram homogeneizadas em tampão (RIPA-Buffer – Sigma Aldrich), centrifugadas a 12700 x g, durante 12 min a 4° C, o pellet foi descartado e o sobrenadante utilizado. Em seguida, a concentração de proteína de cada amostra será determinada pelo ensaio da proteína do ácido bicinonínico (Thermo Fisher Scientific), e o β -mercaptanol será

adicionado nas amostras a uma concentração final de 8%. Todas as amostras conterão uma concentração de proteína de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Desta forma, será utilizado uma quantidade de 10 μL de amostra, contendo 20 μg de proteína, que será submetida a uma eletroforese em gel de SDSpoliacrilamida com 4% -12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o sistema de transferência Trans Blot® Turbo™, no qual a carga de proteína será confirmada pela solução de Ponceau S (Sigma Aldrich - P 7170).

Após o bloqueio com BSA 4%, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários específicos (Anti-trombina 1:1000; Anti-PAR-1 1:1000; Anti-AKT t/p 1:1000; Anti-ERK1/2 1:1000; Anti-P70S6K 1:1000; Anti-EAAT-1 1:1000; Anti-GFAP 1:1000; Anti-NKA t/p 1:1000; Anti Il-1b 1:1000; Antif TNF-a 1:1000) para a determinação das proteínas desejadas. Logo após, a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T (TBS mais 0,1% Tween 20) à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rabbit (1: 5000), por 2h à temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por quimiluminescência aumentada utilizando substrato ECL Western Blotting (Pierce ECL, BioRad) e os sinais foram capturados com o fotodocumentador ChemiDoc MP imaging system + (BioRad).

As bandas foram quantificadas usando o software Image Lab (Bio-Rad) e o Ponceau de cada membrana foi usado para corrigir a expressão de proteína encontrada. O resultado final de intensidade de sinal de cada banda foi expresso em % em relação ao controle. De acordo com (FUNCK, 2014) com pequenas modificações.

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Será utilizado teste T e análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do Teste de Tukey para verificar os resultados obtidos. Valores significativos serão apresentados quando $P < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

A figura 7 demonstra a expressão de trombina e do seu receptor PAR-1 no hipocampo ipsilateral de ratos submetidos a trauma grave. No gráfico (A) a análise estatística mostrou um aumento significativo da presença de trombina no parênquima cerebral após 6 horas do TCE. Assim como também houve um aumento na expressão proteica do receptor para trombina PAR-1 clivado (forma ativa) após o TCE no gráfico (B).

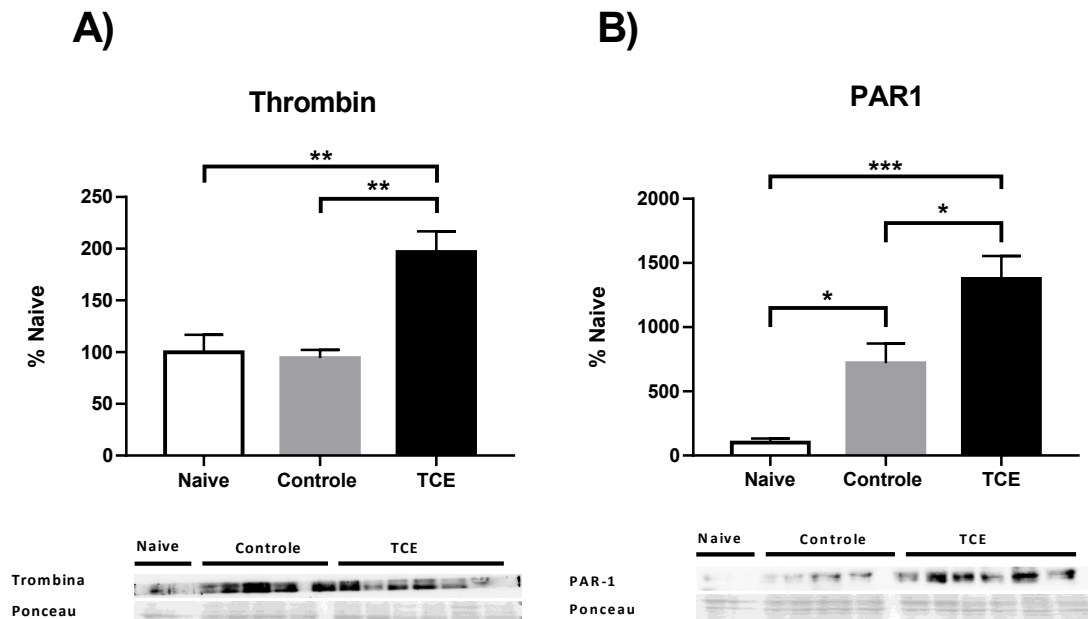


Figura 7: (A) O TCE aumentou a expressão de trombina em 6 horas após o trauma quando comparado aos grupos NAIVE e CONTROLE, (**= $p < 0,001$). No gráfico B), houve diferença na expressão de PAR-1 entre o grupo NAIVE/CONTROLE e CONTROLE/TCE (*= $p < 0,05$), assim como entre os grupos NAIVE/TCE (**= $p < 0,0002$).

A figura 8 mostra a razão da proteína p/t-AKT e p/t-P70, nos gráficos (A) e (C) respectivamente. No gráfico (B), é mostrado a expressão proteica total de ERK 1/2. A análise

estatística revela um aumento da expressão destas proteínas em 6 horas após o TCE, quando comparados ao grupo controle e naive.

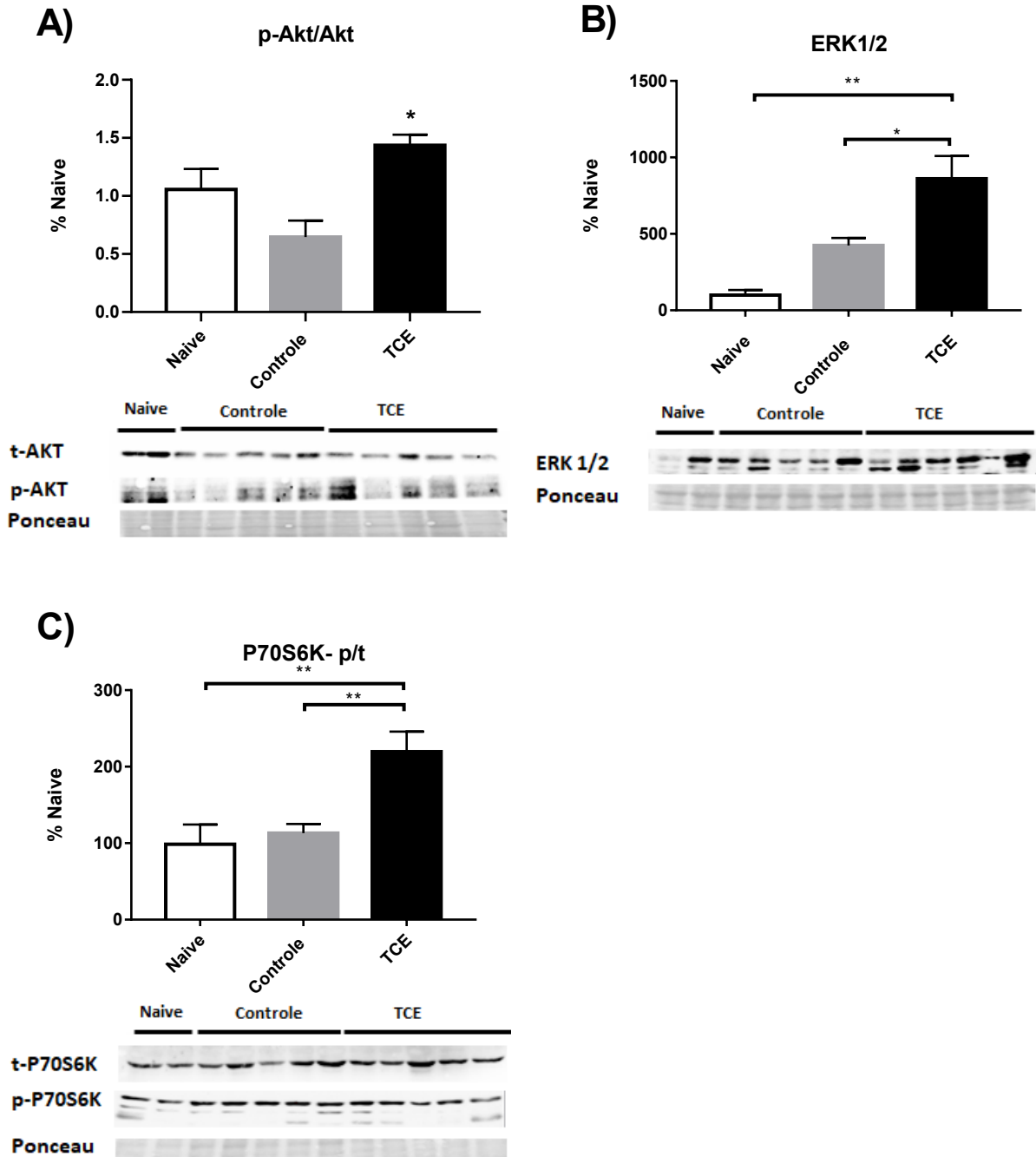


Figura 8: A razão entre a expressão total e fosforilada de AKT, gráfico (A) aumentou significativamente entre o grupo TCE e CONTROLE ($*=p<0,001$). Já a razão da expressão de P70S6K, gráfico (C) demonstrou um aumento em 6 horas após o trauma quando comparada aos

grupos NAIVE e CONTROLE (**= $p < 0,002$). No gráfico (B), a expressão total de ERK 1 e2 apresentou um aumento após o TCE quando comparado aos grupos NAIVE e CONTROLE, (**= $p < 0,001$ e *= $p < 0,01$ respectivamente).

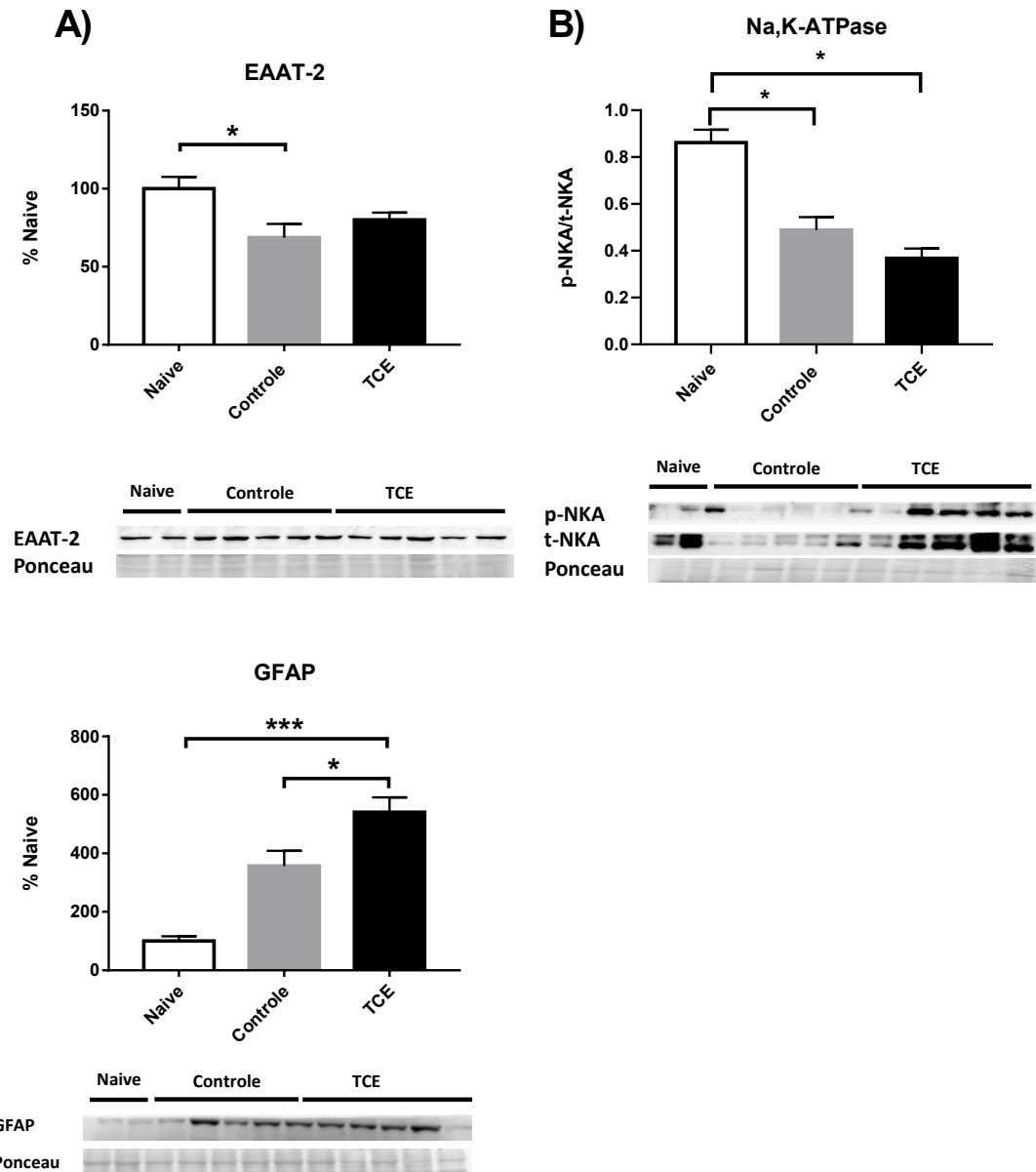


Figura 9: No gráfico (A) é demonstrado uma diminuição da expressão de EAAT-2 no grupo CONTROLE em relação ao grupo NAIVE (*= $p < 0,05$). Já quanto a razão de p-NKA/t-NKA houve uma diminuição no grupo TCE e CONTROLE quando comparados ao grupo NAIVE (*= $p < 0,05$), gráfico (B). Assim como no gráfico (C) é demonstrado a expressão de GFAP aumentada no grupo TCE em relação ao NAIVE e CONTROLE (**= $p < 0,001$ e *= $p < 0,05$ respectivamente).

A figura 9 demonstra o efeito do TCE sobre a expressão de marcadores relacionados a atividade neuronal. No gráfico (A), a análise estatística revela uma diminuição da expressão dos transportadores de glutamato EAAT-2 no grupo CONTROLE em relação ao NAIVE, porém não houve diferença entre os grupos TCE e CONTROLE ou NAIVE. Após o trauma teve um aumento na expressão de GFAP, mostrada no gráfico (B), assim como houve uma diminuição na razão da p/t-NKA.

A figura 10 mostra os marcadores pro-inflamatórios analisados neste trabalho. A análise estatística mostrou um aumento da expressão das proteínas IL-1 β (A) e TNF- α (B) no hipocampo ipsilateral em 6 horas após o TCE.

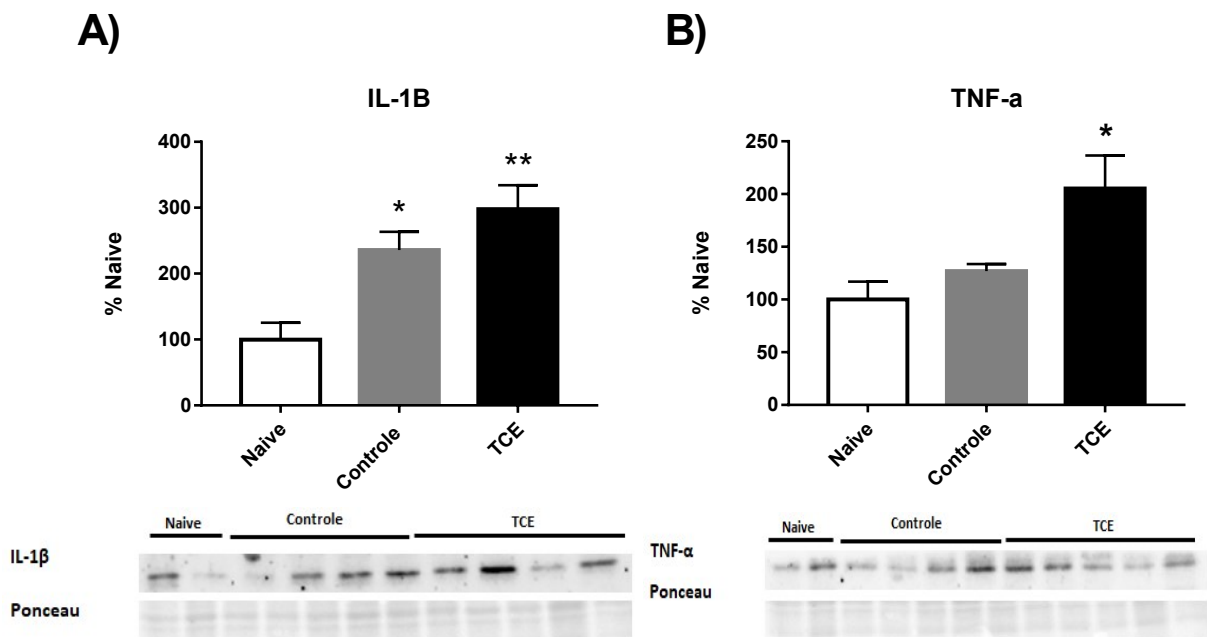


Figura 10: No gráfico (A), houve um aumento da expressão de IL-1 β após 6 horas do trauma no grupo TCE comparado com o grupo NAIVE e no grupo CONTROLE em relação ao NAIVE (**= $p < 0,001$ e *= $p < 0,05$ respectivamente).

Na figura 11 estão representados os resultados referentes as análises de EEG. A análise estatística revelou que o TCE diminuiu a latência para a primeira crise e aumentou o tempo médio de duração dos eventos, gráficos (A) e (B) respectivamente. Quanto a análise do número de “pontas/polipontas” (C) e na frequência (D) o TCE aumentou significativamente quando comparados ao período basal.

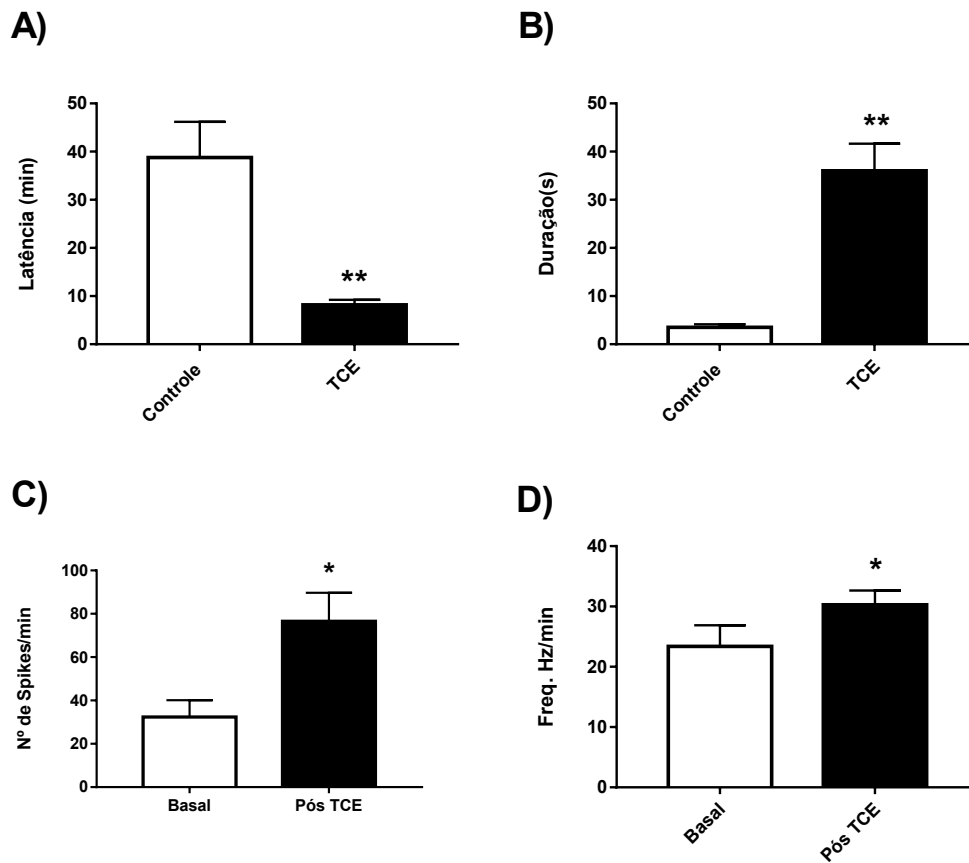


Figura 101: A latência para a primeira crise diminuiu no grupo TCE assim como aumentou a duração média das crises comparado com os animais controle, gráficos (A) e (B) (** = $p < 0,001$). Nos gráficos (C) e (D) é demonstrado o Nº de polipontas e a frequência em Hz dos registros aonde o TCE aumentos os eventos epileptiformes (* = $p < 0,001$).

Na figura 12 está representado as imagens demonstrativas dos registros EEG com a identificação dos eventos epileptiformes de acordo com os parâmetros estipulados previamente na metodologia.

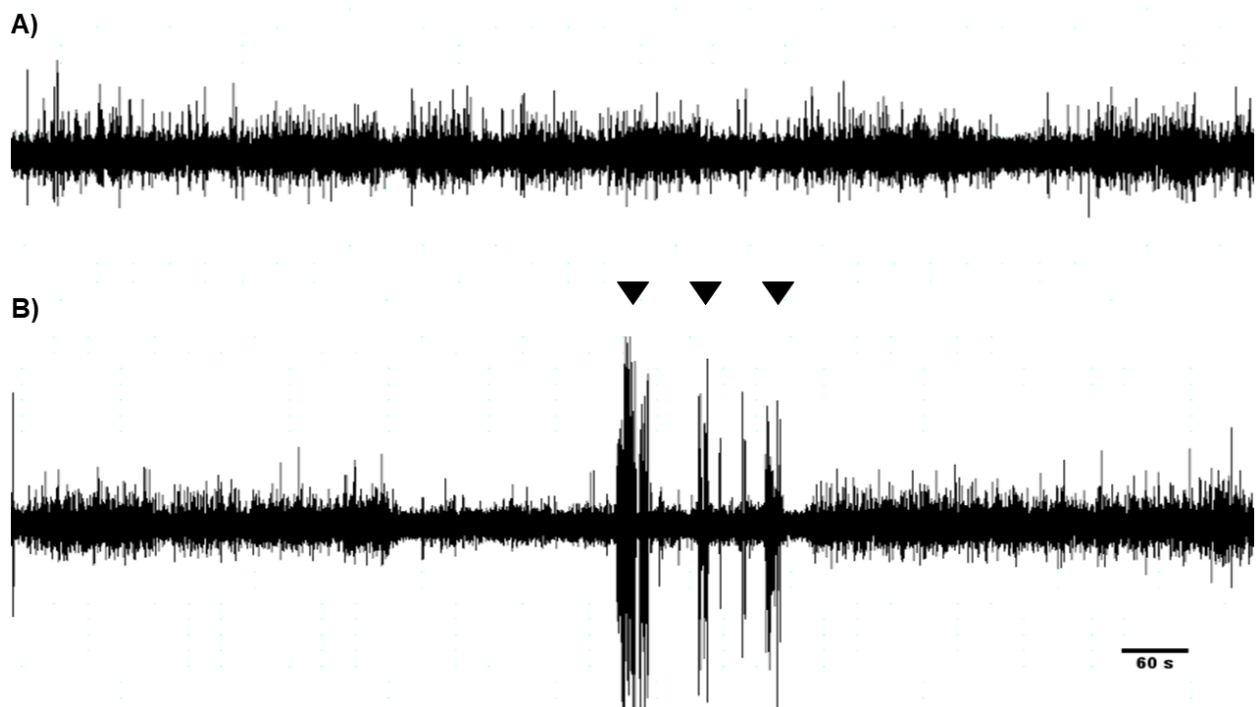


Figura 112: (A) Demonstrativo do período basal e (B) demonstrativo dos eventos epileptiformes identificados durante as 6 horas após o TCE.

Na figura 13 é apresentado a análise espectral dos registros de EEG onde é analisado a força total das ondas em Volts^2 pela frequência em 5-35 Hz no decorrer do tempo do registro.

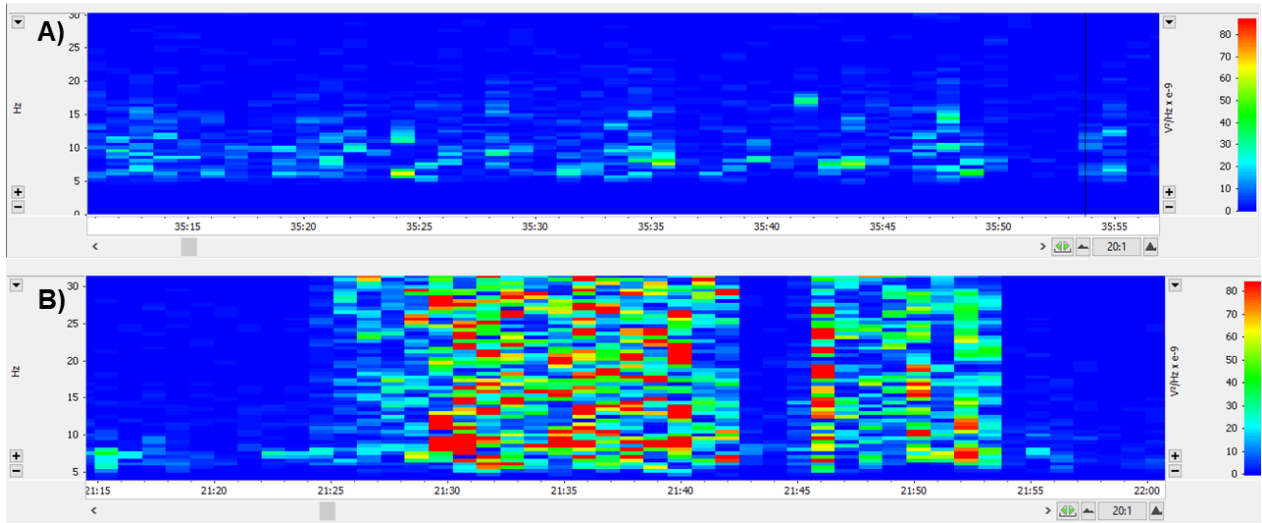


Figura 123: Demonstrativo das análises espectrais referente ao período basal (A) e após o TCE (B).

5.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Previamente, podemos concluir que estes resultados sugerem que o TCE grave provoca o aumento de trombina em células do hipocampo, assim como é capaz de induzir alterações eletroencefalográficas e crises convulsivas precoces durante as 6 primeiras horas após o trauma. Estas alterações podem estar sendo desencadeadas pelo aumento dos marcadores inflamatórios, aumento da ativação de P70S6K e redução de proteínas reguladoras da homeostase extracelular.

6. DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento das melhorias nos serviços de emergência, o aumento do número de sobreviventes após TCE grave vem aumentando e possibilitando maior tempo para intervenções terapêuticas, assim como, o investimento em estudos clínicos sobre os danos secundários do TCE (KIM e YUN, 2020). Sendo assim, o desenvolvimento de doenças neurológicas fica mais evidente com o aumento do tempo de vida dos indivíduos acometidos por um TCE. Nesta linha de pensamento, podemos destacar o desenvolvimento da EPT, uma doença adquirida através das alterações neuroquímicas e estruturais no encéfalo induzidas pelo dano mecânico do trauma. O TCE grave é a uma das maiores causas de epilepsia adquirida no mundo, chegando a desenvolver a EPT em 50% dos indivíduos que sofrem uma lesão (SEMPLE et al., 2019). Desta forma, existe a necessidade de esclarecer estes mecanismos iniciais após um TCE na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos para reduzir ou minimizar os danos causados. Como podemos ver na revisão bibliográfica, a prática de exercício físico exerce um efeito profilático nos sistemas vasculares, inflamatórios e oxidativos modulando as respostas celulares após um dano no tecido nervoso, além de diminuir a permeabilidade da BHE, também apresenta um efeito protetor quanto a geração de trombina após um dano tecidual.

Visto a importância do sistema neurovascular no desenvolvimento de crises epiléticas resolvemos analisar a relação da trombina em um modelo experimental de TCE. Como já descrito por (SALEHI et al., 2017), o TCE grave induz ao aumento da permeabilidade da BHE, dano hemorrágico e morte neuronal por hipóxia. Nossos resultados mostraram estar em acordo com a literatura, pois foi possível ver um aumento dos níveis proteicos de trombina ativa no parênquima cerebral em 6 horas após o TCE grave. A trombina, quando em sua forma ativa é capaz que auxiliar nos processos de coagulação, fazendo a conversão de fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Entretanto, ela pode desempenhar um papel intracelular através da ativação dos seu principal receptor no SNC, o PAR-1 (CHENGWEI et al., 2013; XI et al., 2003). A ativação do PAR-1 em células neuronais está relacionada ao aumento da excitabilidade neuronal, marcadores inflamatórios, como a IL-1b e TNF-a, além de ativar vias de regulação da proliferação celular e autofágicas, como PI3K/AKT e mTOR (PARRALES et al., 2013). Estas alterações neuroquímicas são bem descritas, não apenas após o TCE, mas também durante as crises epiléticas e podem estar relacionadas com a epileptogênese. Durante nossos registros eletroencefalográficos, vimos um aumento no número de eventos epileptiformes nos animais em 6 horas após o TCE, revelando que

houve um aumento na atividade neuronal de forma excessiva e descontrolada. Quando analisamos a expressão de proteínas relacionadas com a manutenção da homeostase química no espaço extracelular, foi observado que o TCE não alterou a expressão dos transportadores de glutamato EAAT-2, entretanto, foi visto um aumento na reatividade astrocitária pelo aumento de GFAP, o que favorece uma maior susceptibilidade a crises epiléticas (DA SILVA FIORIN et al., 2016; PIAO, C. et al., 2015; PIAO, C. S. et al., 2019).

Além disso, alguns autores trazem uma relação do aumento da atividade do complexo 1 da mTOR com a redução dos EAAT-2, resultado que foi confirmado em nossos experimentos, uma vez que houve um aumento na fosforilação da proteína P70S6K e um “*downsteam*” do complexo 1 da mTOR através da ativação de AKT e ERK1/2 (PARRALES et al., 2013). A hiperativação da mTOR está bem descrita na literatura em pacientes diagnosticados com esclerose tuberosa, onde uma deficiência nos complexos tuberosos leva a hiperativação da mTOR e o desenvolvimento de crises epiléticas. Em modelos animais de EPT a hiperativação do complexo 1 da mTOR é diretamente relacionado por desencadear uma proliferação celular excessiva, brotamento axonal e posterior formação das fibras musgosas (DEVINSKY et al., 2018). Ainda nessa linha de pensamento, o aumento de marcadores inflamatórios induzidos pelo TCE, como a IL1-b e TNF-a, também podem favorecer o desenvolvimento de convulsões pela ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA (OLMOS e LLADO, 2014). Adicionalmente, o aumento das concentrações de trombina pode ativar a subunidade NR2B do receptor NMDA, aumentando o influxo de Ca^{2+} intracelular e favorecendo a excitabilidade neuronal (BEN SHIMON et al., 2019).

Desta forma, podemos concluir que o TCE leva a um aumento da permeabilidade da BHE, permitindo a passagem de proteases do sangue, como a trombina, o que leva a ativação de vias relacionadas com a proliferação celular, inflamatórias e de excitabilidade neuronal através da ativação do receptor PAR-1. Estes danos secundários, desencadeados após o trauma, podem ser minimizados ou evitados pelo efeito profilático do exercício físico, uma vez que, as adaptações dos sistemas antioxidantes e anti-inflamatórios podem diminuir a permeabilidade da BHE reduzindo os níveis de trombina no parênquima cerebral. No geral, estas alterações causadas pelo TCE podem estar sendo responsáveis pelas mudanças na atividade neuronal vistas nos registros EEG e podem ser um indício de um processo de epileptogênese.

7. CONCLUSÃO

Desta forma, podemos concluir de forma geral que, ao submeter os animais ao modelo de TCE grave por percussão de fluidos, foi observado o aumento de trombina no hipocampo dentro das 6 horas após a lesão, assim como, induziu ao aparecimento de crises convulsivas precoces após o trauma.

Estas alterações podem estar relacionadas com o papel pro-inflamatório e pro-excitotóxico desempenhado pela trombina ao se ligar no receptor PAR-1. As respostas intracelulares desencadeadas pela trombina levam a ativação da via PI3K/AKT/mTORC1 e podem favorecer a excitabilidade neuronal. Além disso, a hiperativação da mTORC1 pode causar uma proliferação neuronal excessiva e desordenada, assim como aumentar o brotamento axonal. Sendo assim, estas alterações encontradas, nessa fase inicial após o TCE, podem ser um indício de um processo epileptogênico pós-traumático.

Considerando todos os dados apresentados nesta dissertação, podemos sugerir que as alterações secundárias após o TCE podem ser atenuadas pelo efeito profilático do exercício físico. As adaptações geradas pelo exercício físico prévio, a nível central, podem reduzir a permeabilidade da BHE e, conseqüentemente diminuir a presença de trombina no parênquima, limitando os danos secundários e reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças neurológicas após TCE.

8. PERSPECTIVA

Como perspectiva para futuros projetos visando elucidar estes possíveis mecanismos, temos o objetivo de realizar experimentos “*in vitro*” expondo as células neuronais à trombina em ratos previamente treinados, assim como, utilizar de antagonistas para esclarecer o papel da trombina na ativação das vias neuroquímicas relacionadas com o desenvolvimento de crises convulsivas. Além disso, também temos como perspectiva analisar este protocolo de TCE grave durante o processo de desenvolvimento de EPT, analisando estes parâmetros não só nessa fase precoce após o TCE, mas também em uma fase tardia.

9. REFERENCIAS

- ANWER, F. et al. Post-Traumatic Seizures: A Deep-Dive Into Pathogenesis. **Cureus**, v. 13, n. 4, p. e14395, Apr 10 2021.
- BADIMON, A. et al. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. **Nature**, v. 586, n. 7829, p. 417-423, Oct 2020.
- BARUAH, J. et al. Vascular Integrity and Signaling Determining Brain Development, Network Excitability, and Epileptogenesis. **Front Physiol**, v. 10, p. 1583, 2019.
- BEN SHIMON, M. et al. Thrombin as Key Mediator of Seizure Development Following Traumatic Brain Injury. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 1532, 2019.
- BETJEMANN, J. P.; LOWENSTEIN, D. H. Status epilepticus in adults. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 6, p. 615-24, Jun 2015.
- BLAIR, S. N. et al. A tribute to Professor Jeremiah Morris: the man who invented the field of physical activity epidemiology. **Ann Epidemiol**, v. 20, n. 9, p. 651-60, Sep 2010.
- BLENNOW, K. et al. Traumatic brain injuries. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16084, Nov 17 2016.
- BUSHI, D. et al. Quantitative detection of thrombin activity in an ischemic stroke model. **J Mol Neurosci**, v. 51, n. 3, p. 844-50, Nov 2013.
- CARTERI, R. B. K.; SILVA, R. A. D. Traumatic brain injury hospital incidence in Brazil: an analysis of the past 10 years. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 33, n. 2, p. 282-289, Apr-Jun 2021.
- CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, Nov-Dec 1991.
- CHENGWEI, X. et al. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels and its Thr325Ile polymorphism in breast cancer. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 24, n. 7, p. 698-703, Oct 2013.
- CHOI, H. et al. Epilepsy surgery for pharmacoresistant temporal lobe epilepsy: a decision analysis. **JAMA**, v. 300, n. 21, p. 2497-505, Dec 3 2008.
- D'AMBROSIO, R. et al. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. **Brain**, v. 127, n. Pt 2, p. 304-14, Feb 2004.

DA SILVA FIORIN, F. et al. The Impact of Previous Physical Training on Redox Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats: A Behavioral and Neurochemical Approach. **J Neurotrauma**, v. 33, n. 14, p. 1317-30, Jul 15 2016.

DE ALMEIDA, C. E. et al. Traumatic Brain Injury Epidemiology in Brazil. **World Neurosurg**, v. 87, p. 540-7, Mar 2016.

DE CASTRO, M. R. T. et al. Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats. **J Physiol**, v. 595, n. 17, p. 6023-6044, Sep 1 2017.

DE OLIVEIRA THAIS, M. E. et al. Limited predictive power of hospitalization variables for long-term cognitive prognosis in adult patients with severe traumatic brain injury. **J Neuropsychol**, v. 8, n. 1, p. 125-39, Mar 2014.

DE SILVA, M. J. et al. Patient outcome after traumatic brain injury in high-, middle- and low-income countries: analysis of data on 8927 patients in 46 countries. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 2, p. 452-8, Apr 2009. ISSN 1464-3685 (Electronic) 0300-5771 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782898> >.

DEGRAUW, X. et al. Epidemiology of traumatic brain injury-associated epilepsy and early use of anti-epilepsy drugs: An analysis of insurance claims data, 2004-2014. **Epilepsy Res**, v. 146, p. 41-49, Oct 2018.

DEVINSKY, O. et al. Epilepsy. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, p. 18024, May 3 2018.

DEWAN, M. C. et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. **J Neurosurg**, p. 1-18, Apr 1 2018.

FAUL, M.; CORONADO, V. Epidemiology of traumatic brain injury. **Handb Clin Neurol**, v. 127, p. 3-13, 2015.

FERREIRA IDE, L.; TABOSA E SILVA, T. P. [Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003]. **Cien Saude Colet**, v. 14, n. 1, p. 89-94, Jan-Feb 2009.

FISHER, R. S. The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 6, p. 48, Jun 2017.

FLETCHER-SANDERSJOO, A. et al. Time Course of Hemostatic Disruptions After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Literature. **Neurocrit Care**, Jun 30 2020.

GAILLARD, W. D. et al. Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, n. 9, p. 2147-53, Sep 2009.

GODOY, D. A. et al. General care in the management of severe traumatic brain injury: Latin American consensus. **Med Intensiva (Engl Ed)**, v. 44, n. 8, p. 500-508, Nov 2020.

GUPTA, P. K. et al. Subtypes of post-traumatic epilepsy: clinical, electrophysiological, and imaging features. **J Neurotrauma**, v. 31, n. 16, p. 1439-43, Aug 15 2014.

HUNT, R. F. et al. Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 89, 2013.

HUNT, R. F. et al. Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. **Exp Neurol**, v. 215, n. 2, p. 243-52, Feb 2009.

JHA, R. M. et al. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 145, n. Pt B, p. 230-246, Feb 2019.

KENDIRLI, M. T. et al. A model of posttraumatic epilepsy after penetrating brain injuries: effect of lesion size and metal fragments. **Epilepsia**, v. 55, n. 12, p. 1969-77, Dec 2014.

KHELLAF, A. et al. Recent advances in traumatic brain injury. **J Neurol**, v. 266, n. 11, p. 2878-2889, Nov 2019.

KIM, H. W.; YUN, J. H. Treatment Experiences of Traumatic Brain Injury Patients using Doctor-Helicopter Emergency Medical Service: Early Data in a Regional Trauma Center. **Korean J Neurotrauma**, v. 16, n. 2, p. 157-165, Oct 2020.

KRENZLIN, H. et al. The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 1, Jan 11 2016.

LANCASTER, E.; DALMAU, J. Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 7, p. 380-90, Jun 19 2012.

LEE, E. S. et al. Factors associated with neurodevelopment in preterm infants with systematic inflammation. **BMC Pediatr**, v. 21, n. 1, p. 114, Mar 8 2021.

LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 7, p. 829-38, Jun 2001.

LIFSHITZ, J. et al. Clinical relevance of midline fluid percussion brain injury: Acute deficits, chronic morbidities and the utility of biomarkers. **Brain Inj**, v. 30, n. 11, p. 1293-1301, 2016.

LIU, C. L. et al. Changes in autophagy after traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, n. 4, p. 674-83, Apr 2008.

LO, J. et al. A Systematic Review of the Incidence, Prevalence, Costs, and Activity and Work Limitations of Amputation, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Back Pain, Multiple Sclerosis, Spinal Cord Injury, Stroke, and Traumatic Brain Injury in the United States: A 2019 Update. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 102, n. 1, p. 115-131, Jan 2021.

- LUO, W. et al. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. **Brain Res Rev**, v. 56, n. 2, p. 331-45, Dec 2007.
- MAAS, A. I. R. et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. **Lancet Neurol**, v. 16, n. 12, p. 987-1048, Dec 2017.
- MEGIDDO, I. et al. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. **Epilepsia**, v. 57, n. 3, p. 464-74, Mar 2016.
- MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 11, p. 1637-40, Nov 2010.
- MHATRE, M. et al. Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment. **Neurobiol Aging**, v. 25, n. 6, p. 783-93, Jul 2004.
- MUKHTAR, I. Inflammatory and immune mechanisms underlying epileptogenesis and epilepsy: From pathogenesis to treatment target. **Seizure**, v. 82, p. 65-79, Nov 2020.
- NORTJE, J.; MENON, D. K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Curr Opin Neurol**, v. 17, n. 6, p. 711-8, Dec 2004.
- OLMOS, G.; LLADO, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 861231, 2014.
- PARRALES, A. et al. ERK1/2-dependent activation of mTOR/mTORC1/p70S6K regulates thrombin-induced RPE cell proliferation. **Cell Signal**, v. 25, n. 4, p. 829-38, Apr 2013.
- PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scand J Med Sci Sports**, v. 25 Suppl 3, p. 1-72, Dec 2015.
- PEETS, A. D. et al. Prolonged refractory status epilepticus following acute traumatic brain injury: a case report of excellent neurological recovery. **Crit Care**, v. 9, n. 6, p. R725-8, 2005.
- PIAO, C. et al. Thrombin decreases expression of the glutamate transporter GLAST and inhibits glutamate uptake in primary cortical astrocytes via the Rho kinase pathway. **Exp Neurol**, v. 273, p. 288-300, Nov 2015.
- PIAO, C. S. et al. Depression following traumatic brain injury in mice is associated with down-regulation of hippocampal astrocyte glutamate transporters by thrombin. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 39, n. 1, p. 58-73, Jan 2019.
- PITKANEN, A. et al. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 21-9, Feb 2009.

- PITKANEN, A. et al. Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 2, p. 13-20, 2007.
- PITKANEN, A.; MCINTOSH, T. K. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 241-61, Feb 2006.
- PLESERU, A. M.; MIHAILA, R. G. The role of thrombin in central nervous system activity and stroke. **Clujul Med**, v. 91, n. 4, p. 368-371, Oct 2018.
- PREUX, P. M. et al. Epidemiology of febrile seizures and epilepsy: a call for action. **J Pediatr (Rio J)**, v. 91, n. 6, p. 512-4, Nov-Dec 2015.
- RADAK, Z. et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 10, p. 1208-46, Apr 1 2013.
- RAVIZZA, T. et al. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 223-30, Jun 27 2011.
- RIIKONEN, R. Infantile spasms: therapy and outcome. **J Child Neurol**, v. 19, n. 6, p. 401-4, Jun 2004.
- ROYES, L. F. F.; GOMEZ-PINILLA, F. Making sense of gut feelings in the traumatic brain injury pathogenesis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 102, p. 345-361, Jul 2019.
- SALEHI, A. et al. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 37, n. 7, p. 2320-2339, Jul 2017.
- SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, Apr 2017.
- SCHWARZBOLD, M. L. et al. Validity and screening properties of three depression rating scales in a prospective sample of patients with severe traumatic brain injury. **Braz J Psychiatry**, v. 36, n. 3, p. 206-12, Sep 2014.
- SEMPLE, B. D. et al. Affective, neurocognitive and psychosocial disorders associated with traumatic brain injury and post-traumatic epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 123, p. 27-41, Mar 2019.
- SILVER, J. M. et al. **Textbook of traumatic brain injury**. Third edition. Washington, DC: American Psychiatric Association Publishing, 2019. xxxii, 953 pages ISBN 9781615371129.
- SILVERSIDES, J. A. et al. Social deprivation and childhood injuries in North and West Belfast. **Ulster Med J**, v. 74, n. 1, p. 22-8, May 2005.
- SPEED, C.; JAQUES, R. High-performance sports medicine: an ancient but evolving field. **Br J Sports Med**, v. 45, n. 2, p. 81-3, Feb 2011.