



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**O papel da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no comportamento  
depressivo em modelo de concussão recorrente em camundongos**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Leandro Machado Severo Feiteiro**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2020**

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

**Leandro Machado Severo**

**O papel da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no comportamento depressivo em modelo de concussão recorrente em camundongos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2020**

**Leandro Machado Severo Feiteiro**

**O PAPEL DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO  
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM MODELO DE CONCUSSÃO RECORRENTE  
EM CAMUNDONGOS**

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**

**Orientador Luiz Fernando Freire Royes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2020**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Feiteiro , Leandro  
O PAPEL DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE  
OXIDATIVO NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM MODELO DE  
CONCUSSÃO RECORRENTE EM CAMUNDONGOS / Leandro Feiteiro  
. - 2020.  
77 p. ; 30 cm

Orientadora: Luiz Fernando Freire Royes  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica,  
RS, 2020

1. Concussões recorrentes 2. Depressão 3.  
Bioenergética mitocondrial 4. hipocampo I. Freire  
Royes, Luiz Fernando II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFEM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LEANDRO FEITEIRO , para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Leandro Machado Severo Feiteiro**

**O PAPEL DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE  
OXIDATIVO NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM MODELO DE  
CONCUSSÃO RECORRENTE EM CAMUNDONGOS**

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 22 de Outubro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

---

Michel Fleith Otuki, Dr. (UFPR)

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2020**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha família e principalmente ao meu pai, por te me educado com valores que me fizeram jamais desistir dos meus sonhos, independente das dificuldades encontradas no caminho. Além disso, me ensinou que a verdadeira família é unida pelo espírito e não pelo sangue. Dessa forma, aqui fica minha extrema admiração e agradecimento por fazer parte da minha vida.

À minha esposa Carol, só tenho a agradecer, por todo apoio e compreensão em momentos difíceis, sempre disposta ajudar em tudo que me proponho a lutar. Obviamente, não poderia deixar de falar da minha filha que nos momentos estressantes ao chegar em casa me fazia voltar a inocência de ser criança e com pequenos risos me fazia ter força para continuar de pé na tentativa de sempre ser melhor a cada dia.

Entre os vários conselhos que recebi do pai um dos mais notáveis para mim é “quer ser o melhor ande com os melhores”. Sendo assim, aqui fica a minha gratidão para os Professores Luiz Fernando, Michele e Mauro pelos ensinamentos. Também, não posso de deixar de falar de todo o pessoal do Bioex que estão sempre dispostos ajudar e trabalhar independente do dia, do horário e forma. Além disso, por proporcionar um ambiente de trabalho divertido e leve.

Quero agradecer especialmente ao Godinho e o Felipe por estarem na linha de frente na execução desse projeto, pois, tornaram as coisas muito mais simples e agradáveis na hora dos experimentos. Além disso, no meio do caos sempre achavam alguma forma de te colocar para cima e sempre dispostos a resolver problemas que apareciam ao longo de horas e horas de bancada.

Obrigado a Todos!

## RESUMO

### O PAPEL DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM MODELO DE CONCUSSÃO RECORRENTE EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Leandro Machado Severo Feiteiro  
ORIENTADOR: Dr. Luiz Fernando Freire Royes

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é uma lesão caracterizada pela aplicação mecânica de uma força externa ao encéfalo. Atualmente, 80 a 90% dos casos de traumatismo cerebrais são considerados concussões ou TCE leve, que são normalmente negligenciadas quanto ao perigo que oferecem de forma isolada. Conquanto, a somatória das concussões ao longo da vida pode mudar a neuroquímica do encéfalo, que está relacionada com a atrofia cerebral, disfunção mitocondrial, aumento das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO / ERN), bem como neuroinflamação. Essas mudanças podem facilitar o surgimento de comorbidades, como a depressão, sendo o distúrbio psiquiátrico que surge com maior frequência após o TCE. Apesar disso, maior parte das pesquisas com esse tipo de lesão tem focado nos déficits funcionais e estresse oxidativo, enquanto mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos após as concussões permanece pouco pesquisado. Neste sentido, o presente trabalho objetivou investigar o envolvimento do metabolismo mitocondrial e do estresse oxidativo em um possível comportamento depressivo induzido por concussões recorrentes em camundongos. Para tal, camundongos swiss foram submetidos a diferentes números de lesões (4, 7 e 10 traumas), e o tempo de imobilidade foi avaliado pelo teste suspensão pela cauda (TSC) 48 horas após última lesão. Em seguida, seis dias após o último trauma os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi retirado para análises bioquímicas. Nesse sentido, a bioenergética mitocondrial foi analisada pela respirometria de alta resolução (OROBOROS, Instruments). Além disso, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como, os níveis das defesas antioxidantes foram mensurados em hipocampo de camundongos. Os dados estatístico do presente trabalho com o protocolo de concussões recorrentes (4, 7 e 10 lesões) em camundongos não alteraram o tempo de imobilidade no TSC. Por outro lado, houve diminuição da respiração mitocondrial e aumento nos níveis de EROs, bem como, o aumento da expressão de proteínas antioxidantes como, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) e superóxido dismutase 2 (SOD2). Portanto, o presente estudo relatou que diferentes números de concussões recorrentes não foi capaz de induzir a um comportamento do tipo depressivo em camundongos. Entretanto, houve uma diminuição da bioenergética mitocondrial nos animais submetidos ao volume de 10 lesões, porém, essa mudança não foi associada com um possível aparecimento do comportamento do tipo depressivo. Além disso, os animais expostos a repetição de 10 traumas obtiveram aumento na ativação do fator de transcrição de enzimas endógenas, que tem sido associado com o atraso ou inibição de eventos secundários envolvidos nessa doença neurológica.

**Palavras-Chave:** Concussões recorrentes, depressão, bioenergética mitocondrial e hipocampo

## ABSTRACT

### THE ROLE OF MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS AND OXIDATIVE STRESS IN DEPRESSIVE BEHAVIOR IN RECURRENT CONCUSSION MODEL IN MICE

AUTHOR: Leandro Machado Severo Feiteiro

ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes

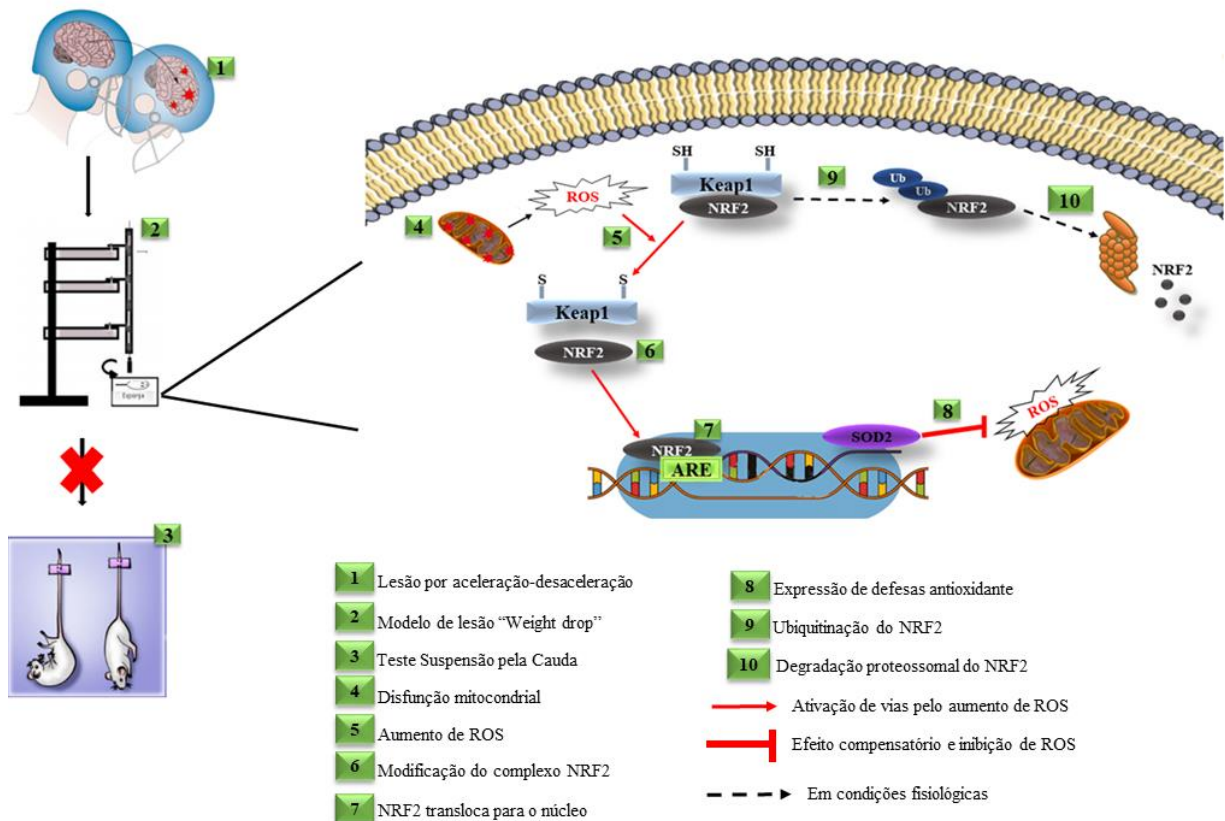
The traumatic brain injury (TBI) is one lesion occasioned by the mechanical application of a force external to the brain. Currently, 80 to 90% of cases of TBIs are considered concussion or mild TBI, in which contain the symptoms commonly resolved in the first weeks following injury. On the other hand, recurrent episodes of mild TBI or concussion lifelong can alter neurochemistry of encephalon in which are linked with brain atrophy, production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS/RNS), mitochondrial dysfunction, and inflammation. These changes can trigger emergence of diseases, such as major depression, disorder psychiatric with great incidence after TBI. Despite this, Most of the research of this injury has been focused on oxidative stress and functional deficits; however, mechanisms that underlie the development of neuropsychiatric disorders remain little researched. Due to this, the present authors investigated the involvement of the mitochondrial metabolism and of the oxidative stress in a possible depressive behavior induced for a recurrent concussion protocol in mice. In this way, the rodents were submitted to different numbers of injuries (4, 7 and 10 traumas), and the immobility time was evaluated by the tail suspension test (TSC), as well as, mitochondrial bioenergetics was analyzed by high-resolution respirometry (OROBOROS, Instruments). In addition, the levels of reactive oxygen species (ROS), as well as, the rate of antioxidant defenses were measured at the hippocampus of mice. The experimental data revealed, for the first time, that the present protocol of recurrent concussions (4, 7, and 10 injuries) in mice did not alter immobility time during tail suspension tests (TSTs), but decreased hippocampal mitochondrial respiration and increased expression of proteins such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and superoxide (SOD2). This experimental data suggests that bioenergetic changes elicited by recurrent concussion did not induce depressivelike behavior, but activated the transcription factor of responsive antioxidant elements (ARE) that delay or prevent secondary cascades in this neurological disease.

**Keywords:** Recurrent concussion, depression, mitochondrial bioenergetics, and hippocampus



## GRAPHICAL ABSTRACT

AUTOR: Leandro Machado Severo Feiteiro  
 ORIENTADOR: Dr. Luiz Fernando Freire Royes



Lesão por aceleração-desaceleração no esporte acomete em micro lesões ao longo do encéfalo (1). Modelo de lesão experimental (weight drop) que mimetiza as concussões em cenário esportivo (2) não alterou o tempo de imobilidade no TSC após diferentes números de traumas (3). Apesar disso, foi capaz de ocasionar disfunção mitocondrial após 10 lesões (4), levando o aumento nos níveis das espécies reativas (5), na qual foi responsável por levar ativação do fator de transcrição Nrf2 (6,7) e o aumento da enzima antioxidante mitocondrial SOD2 (8), que impede ou atrasa o aumento os danos oxidativos. Em condições fisiológicas com baixos níveis de espécies reativas, o Nrf2 é acometido por Ubiquitinação (9) e degradação proteossomal (10).

## LISTA DE GRÁFICOS

### **Manuscrito**

Figura 1. Desenho Experimental.....59

Figura 2.O efeito dos diferentes números de concussões recorrente.....60

### **Material suplementar**

Figura 1. O Tempo de inconsciência dos camundongos após a lesão.....61

Figura 2. Representativo da respirometria de alta resolução em homogenatos de hipocampo de camundongos submetidos a 4, 7 e 10 lesões .....62

## LISTA DE TABELA

### **Introdução**

Tabela 1 – Escala de coma de Glasgow .....	19
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE- Elemento de Resposta antioxidante  
CDC- Center for Disease Control  
CCI- Impacto Cortical Controlado  
ECG- Escala de Coma de Glasgow  
EUA- Estados Unidos da América  
NMDAR- N-Metil D Aspartato  
LPF- Lesão por Percussão de Fluido  
TCE- traumatismo Cranioencefálico  
WD- Weight Drop  
ADP - Adenosina difosfato  
ACTH- hormônio adrenocorticotrofina  
CRH- hormônio liberador de corticotropina  
NADH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase- sódio e potássio  
ATP- Adenosina Trifosfato  
RL- Radical Livre  
DSM-V- Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais  
OMS- organização mundial da saúde  
5-HT- 5-hidroxitriptamina  
NE- Norepinefrina  
DA- Dopamina  
SNC- Sistema Nervoso Central  
TH- Tirosina Hidroxilase  
TPH2- triptofano hidroxilase 2  
VTMA- Vesículas Transportadoras de Monoaminas  
MAO- Monoaminoxidase  
SERT- Transportadores Específico de Serotonina  
NET- Transportadores Específicos de Norepinefrina

ISRS- Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina

IRSN- Inibidores de Recaptação da Serotonina-Noroepinefrina

HPA- Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

GR- receptor glicocorticoide

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alpha

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO .....	16
1.1.1 Definição e dados epidemiológicos.....	16
1.1.2 Classificação do TCE .....	17
1.1.2.2 Classificação referente a distribuição da lesão.....	18
1.1.2.3 Classificação do trauma frente a sua gravidade.....	18
1.2 CONCUSSÃO .....	21
1.2.1 Fisiopatologia da Concussão .....	22
1.3 DEPRESSÃO MAIOR .....	24
1.4 CONCUSSÃO E DEPRESSÃO.....	25
1.5 MITOCONDRIA.....	27
1.5.1 Função e bioenergética mitocondrial.....	27
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
1.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	31
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2- OBJETIVO ESPECÍFICO .....	35
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>36</b>
<b>4. MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>55</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7. PERSPECTIVA .....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

## **APRESENTAÇÃO**

No item INTRODUÇÃO está descrita uma revisão geral sobre os assuntos abordados nesta dissertação.

No que tange aos resultados que compõem essa dissertação, tal elemento encontra-se na forma de artigo, situado na seção ARTIGO CIENTÍFICO. Salienta-se, que os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo, na qual representa parte deste trabalho.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÕES encontrados ao final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

Por fim, a seção de REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS refere-se somente as citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO desta dissertação.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

### 1.1.1 Definição e dados epidemiológicos

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é uma lesão caracterizada pela alteração da função cerebral, motivada pela aplicação de uma força externa ao encéfalo (MENON et al., 2010), a qual é constantemente referida como uma epidemia silenciosa (GARDNER AND YAFFE 2015). Nesse sentido, relatórios estatísticos mostram que, atualmente, cerca de 69-74 milhões de pessoas são atingidas pelo TCE mundialmente, assim sendo, um dos maiores contribuintes para morte e invalidez no mundo (DEWAN M. C. et al., 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), por volta de 2.5 milhões de pessoas sofrem TCE anualmente (BARRIO et al., 2015; TAYLOR et al., 2017), nesse linha, dados do CDC (Center for Disease Control) mostram que o número de atendimentos relacionados ao TCE nos postos de emergência aumentaram de 567 casos a cada 100.000 pessoas no ano 2000 para 824 casos a cada 100.000 indivíduos no ano de 2010 (BLENNOW K. et al., 2016), dessa forma, foram gastos em 2010 aproximadamente U\$76.5 bilhões com o enfrentamento desse tipo de lesão (FAUL e CORONADO, 2015). No continente europeu, informações compiladas de 16 países reportam que 262 pessoas em 100.000 são atendidas nos hospitais com esse tipo de trauma por ano (PEETERS W. et al., 2015). No Brasil, o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) estima que o TCE tenha sido responsável por 125.000 internações no período de 2008 a 2012, causando um gasto de aproximadamente de R\$156.300.00 (DE ALMEIDA ET AL., 2016; MAGALHÃES et al., 2017), porém os dados epidemiológicos ainda são escassos no país. Inferindo-se que os indices de TCE podem ser maiores do que é documentado (ELOIA et al., 2011; SANTOS et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2017). Dessa maneira, o evento se caracteriza como um problema de saúde pública no cenário global (DEWAN M. C. et al., 2018). Vale salientar que a população com faixa etária de 10 a 20 anos apresenta maior incidência de TCE, sendo 3,5 vezes maior em homens (DE ALMEIDA et al., 2016). Além disso, recentes estudos indicam que as principais causas que levam a uma lesão cerebral são: quedas (35%), acidentes de trânsito (17%), acidentes de trabalho e prática de esportes (16,5%), assaltos (10%) além de fatores desconhecidos (21%) (FAUL M. et al., 2010). Contudo, apesar do TCE acompanhar a humanidade a muitos anos e apresentar grande ocorrência



atualmente, ainda é necessário esforços para melhor compreender a fisiopatologia do TCE. A identificação e o diagnóstico das alterações advindas do modelo de concussão recorrente serão de suma importância para posterior planejamento de uma estratégia de reabilitação.

### **1.1.2 Classificação do TCE**

Devido à complexidade de sua fisiopatologia, o TCE pode ser classificado como: Mecanismo físicos (Penetrante ou Fechado), distribuição da lesão (difusa ou focal) e índice de gravidade (leve, moderado ou grave) (HAWRYLUK G.W J e MANLEY G. T., 2015).

#### **1.1.2.1 Classificação da lesão em relação ao mecanismo físico**

A determinação do TCE pelo meio físico é a maneira mais simples de sua descrição (HAWRYLUK G.W J e MANLEY G. T., 2015), na qual o momento do impacto pode ser dividido em Penetrante ou Fechado (SAATMAN K. E et al., 2008).

Nesse contexto, o TCE do tipo penetrante é caracterizado por uma perfuração no cérebro pela alta velocidade de um projétil, na qual irá acometer no rompimento do crânio e da dura-máter, assim atingindo o parênquima cerebral causando dano local e exposição do encéfalo (BLENNOW K. et al., 2016). Esse mecanismo é comum em zona de guerra, onde contém armas de fogo e explosões, dessa maneira, gerando traumas severos e expondo o paciente a neurocirurgias e déficits neurológicos intransigentes (SAATMAN K. E et al., 2008; ALAO T, WASEEM M., 2020). A cerca dos TCEs do tipo fechado, o crânio não é atingido por uma perfuração ocasionado por objetos externos. Por outro lado, a aceleração-desaceleração da cabeça na hora do impacto, provoca cisalhamentos, tensões e compressões sobre o encéfalo, por meio da diferença entre a densidade do tecido cerebral e a estrutura óssea craniana. Dessa forma, levando a ruptura de vasos sanguíneos e lesões axonais (GENNARELLI E GRAHAM, 2005; BLENNOW K. et al., 2016). Esse mecanismo de lesão é amplamente encontrado em acidentes de trânsito.

### *1.1.2.2 Classificação referente a distribuição da lesão*

Dano focal: nesse tipo de trauma o cenário é marcado por uma força no momento da colisão que age sobre uma área específica do cérebro, resultando em hemorragias, hematomas subdurais e epidurais, hematomas intraparenquimatosos e morte celular local, por consequência, os indivíduos geralmente necessitam de tratamento cirúrgico com urgência (ANDRIESSEN T. M et al., 2010; SILVER JM. ET AL., 2018) Vale salientar, que o local do cérebro agredido por esse tipo de lesão irá definir o aparecimento de patologias e os danos neurológicos do paciente (ANDRIESSEN T. M et al., 2010).

Dano difuso: Nessa situação, o agravo é caracterizado pela aplicação de uma força externa, causando movimentação de rotação e aceleração-desaceleração do encéfalo dentro da caixa craniana, sendo assim, provocando micro lesões ao longo do tecido cerebral (ANDRIESSEN T. M et al., 2010 BLENNOW K. et al., 2016). Vale lembrar, que as estruturas cerebrais são heterogênicas, em razão disso possuem distintos graus de fixação, bem como, diferentes consistências teciduais (GENTRY LR ET AL., 1988). Como resultado, no momento do impacto esses segmentos heterogênicos movimentam-se de forma desordenada, causando o cisalhamento, forças de tração e compressão do tecido cerebral, marcado principalmente por lesão axonal difusa (ANDRIESSEN T. M ET AL., 2010). Por fim, é importante ressaltar que o dano focal e o dano difuso não necessariamente ocorrem de forma isolada, ou seja, também há possibilidade que esses dois eventos ocorram paralelamente no mesmo quadro clínico (MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, pag. 581).

### *1.1.2.3 Classificação do trauma frente a sua gravidade*

A mensuração da gravidade após o traumatismo torna-se importante para o desfecho clínico do paciente, principalmente, por que esse tipo de lesão expõe o indivíduo a maior suscetibilidade a perda de consciência, convulsões e outros sinais neurológicos (LANGLOIS JA, et al., 2005; DA SILVA. TH, et al., 2018). Embora hoje, contenha diversas tecnologias para mensurar o dano provocado pelo trauma, tal como tomográfica computadorizada e ressonância magnética. Torna-se importante salientar que o indivíduo acometido pela lesão necessita de uma verificação imediata ao acidente. Nesse sentido, ainda é largamente utilizado a Escala de Coma de Glasgow (ECG) após o trauma. O ECG irá verificar seriedade da lesão a partir de das manifestações

comportamentais, como, níveis crescentes de estímulos oculares, verbais e motores, assim produzindo uma pontuação total que será utilizado para classificar a lesão frente a sua gravidade. Desse modo, dividindo-o em três categorias: leve (15 a 13 pontos), moderado (12 a 9 pontos) e grave (8 a 3 pontos), conforme a tabela 1 demonstrado abaixo (TEASDALE e JENNETT, 1974).

### Abertura Ocular

<i>Critério</i>	<i>Verificado</i>	<i>Classificação</i>	<i>Pontuação</i>
Olhos abertos previamente a estimulação	√	Espontâneo	4
Abertura ocular após ordem em tom de voz normal ou tom de voz alta	√	Ao som	3
Abertura ocular após a estimulação da extremidades dos dedos	√	A pressão	2
Ausência persistente da abertura ocular, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Olhos fechados devido o fator local	√	Não testável	NT

### Resposta Verbal

<i>Critério</i>	<i>Verificado</i>	<i>Classificação</i>	<i>Pontuação</i>
Resposta adequada relativamente ao nome, local e data	√	Orientada	5
Resposta não orientada, mas comunicação coerente	√	Confusa	4
Palavras isoladas inteligíveis	√	Palavras	3
Apenas gemidos	√	Sons	2
Ausência de resposta audível, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Fator que interfere com a comunicação	√	Não testável	NT

<b>Resposta Motora</b>			
<i>Critério</i>	<i>Verificado</i>	<i>Classificação</i>	<i>Pontuação</i>
Cumprimento de ordens com 2 ações	√	A ordens	6
Elevação da mão acima do nível da clavícula ao estímulo na cabeça ou pescoço	√	Localizadora	5
Flexão rápida do membro superior ao nível do cotovelo, padrão predominantemente normal	√	Flexão normal	4
Flexão do membro superior ai nível do cotovelo, padrão predominantemente claramente anormal	√	Flexão anormal	3
Extensão do membro superior ao nível do cotovelo	√	Extensão	2
Ausência de movimentos dos membros superiores/inferiores, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Fator que limita resposta motora	√	Não testável	NT

**Tabela 1. Escala de Coma de Glasgow** (<http://www.glasgowcomascale.org>)

Porém, em alguns episódios essa mensuração pode ser inadequada, principalmente se pessoa avaliada apresenta diferença de idioma (avaliador X paciente), sedação, paralisia, ingestão de álcool e outras drogas. Deste modo, dificultando a aplicabilidade da escala para verificar o estado real do paciente. Apesar disso, a ECG ainda é amplamente utilizada como parâmetro de gravidade traumática, imediatamente após a lesão (SILVER JM. et al., 2018). Vale acrescentar, que além da ECG há outras definições para distinguir a seriedade de um TCE. Nessa linha, indivíduos agredidos por esse tipo de lesão que apresentam uma perda de consciência de até 30 minutos, amnésia pós-traumática inferior a 24 horas, déficits neurológicos transientes, como, confusão, desorientação e fala lenta são considerados lesões leves ou concussões que, em partes, são considerados termos equivalentes (KATZ D. I et al., 2015). Por outro lado, caso o paciente exceder uma perda consciência de 30 minutos, amnésia pós-traumática superior a 24 horas, ECG menor que 13 pontos e sem conter características clínicas que correspondam a um trauma grave, esse cenário é definido como um TCE moderado (RUFF R, 2005). Por fim, em relação aos casos

graves de TCE, o paciente apresenta perda de consciência maior que 24 horas, prejuízos respiratórios, sudorese elevada e alterações pressóricas (MAA A. I, et al., 2015).

## 1.2 CONCUSSÃO

A concussão é uma lesão cerebral com processos fisiopatológicos complexos que afeta o cérebro a partir de uma força biomecânica externa, atingindo diretamente a cabeça, o rosto ou qualquer outra parte do corpo que transmita força impulsiva para cabeça (MCCRORY P. et al., 2013; GRAFF e CAPERELL, 2016). Assim, a concussão é marcada pela aceleração-desaceleração no momento do impacto, levando ao chamado “efeito chicote”, sendo encontrado amplamente em acidentes automobilísticos e esportes de contato. Além disso, torna-se importante enfatizar que os efeitos deletérios provocados pelo TCE são uma somatória entre o dano primário e o dano secundário, e o mesmo ocorre em uma concussão. O dano primário incide no momento do impacto aplicado pela força externa, como citado anteriormente, podendo acarretar em fraturas ósseas (nos casos de TCE moderado e grave) e danos axonais (MCCRORY, P et al., 2013; GRAFF e CAPERELL, 2016). No tocante o dano secundário, esse é relacionado com respostas celulares e moleculares que podem persistir por dias, meses e até anos após a lesão (SAATMAN et al., 2008). Atualmente, é sabido que 80-90% dos casos de TCEs são considerados concussões ou TCE leve e, que apesar dessas terminologias conter significados equivalentes, estudos vem sugerindo que as concussões possuem uma identidade própria, onde as mudanças no padrão estrutural de imagem do cérebro e a perda de consciência não são necessariamente presentes (MCCRORY P. et al., 2013; GRAFF e CAPERELL, 2016; BLENNOW, K. et al., 2016).

Quanto as atividades esportivas, nos EUA estima-se que 300,000 concussões estão relacionadas com o esporte anualmente, dessa forma, perdendo apenas para colisões automobilísticas (MARAR M. et al., 2012). Nesse contexto, esportes com maior suscetibilidade de indução as concussões, são aqueles com características de contatos ou colisões, tais como futebol americano, boxe, hóquei no gelo, futebol, rúgbi e artes márcias, além disso, esportes de alta velocidade como ciclismo, corrida de automóveis e patinação (BARRY D. J., 2013). No Brasil, os parâmetros estatísticos sobre lesões concussivas dentro do esporte, no geral são escassos (CRESPO C A., 2011). Entretanto, um relatório divulgado em 2017 pela confederação brasileira de futebol (CBF), sobre as lesões sofridas por atletas durante o campeonato brasileiro de 2016 foram

alarmantes. Pois, episódios envolvendo a cabeça do jogador foi segundo maior índice de lesão, sendo 37,93% desses atletas diagnosticado concussão cerebral. Outro fator importante, está relacionado a faixa-etária das pessoas que sofrem de lesões neurotraumáticas no Brasil, na qual indivíduos de 15 a 24 anos são os mais acometidos por esse dano (MARAR M. et al., 2012), porém, especificamente no estado do Ceará, no período entre 2010 e 2011, 18,1% dos atendimentos eram sujeitos com idade de 10 a 20 anos (ELOIA et al., 2011). Vale ressaltar, que em adultos esse tipo de lesão tende a se resolver em até 7 dias, entretanto, em crianças e adolescentes o mesmo não acontece, pois o período de recuperação pode ser mais longo, tornando-se importante a compreensão da lesão nesse público (MCCREA M. et al., 2003; BARRY D. J., 2013). Dessa forma, pesquisas tem apontado que o período da adolescência é um momento importante da maturação cerebral, que inclui rearranjos anatômicos e funcionais, bem como, aumento nas taxas de mielinização e expressão de receptores glicocorticoides (ANDERSEN S. L e TEICHER M. H, 2008). Sendo assim, essa fase é atribuída como uma janela de vulnerabilidade cerebral, e insultos nesse período podem prejudicar o desenvolvimento cognitivo e emocional, desse modo, levando a um aumento na suscetibilidade para o aparecimento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos (IKONOMIDOU C. E KAINDL A M. 2011; SEMPLE BD et al., 2013)

### **1.2.1 Fisiopatologia da Concussão**

Em relação aos processos fisiopatológico da concussão, o cisalhamento dos axônios e a disrupção da membrana celular em diferentes regiões cerebrais, provocado pela aceleração-desaceleração no momento do impacto, levam a uma ativação de diferentes vias neuroquímicas e neurometabólicas. Nesse cenário, uma despolarização intensa e descontrolada imediatamente após a colisão, resulta em uma liberação indiscriminada de neurotransmissores excitatórios, sendo em maior escala a liberação de glutamato na fenda sináptica (BARKHOUDARIAN et al., 2016). Em seguida, há uma ativação dos receptores de glutamato pós-sináptico N-Metil D Aspartato (NMDAR), que por sua vez irá ocasionar um acentuado influxo de  $Ca^{2+}$ , dessa maneira, provocando a quebra da homeostase iônica neuronal e propagação da despolarização (FADEN, AI et al., 1989; SIGNORETTI S. et al., 2011). Conseqüentemente, na tentativa de restabelecer esse equilíbrio iônico após o trauma há uma grande demanda energética (BARKHOUDARIAN et al., 2016). No entanto, com o excesso de  $Ca^{+2}$  no meio intracelular dos neurônios, a mitocôndria na

tentativa de equilibrar a sobrecarga desses íons no citosol provoca a sua própria disfunção, elevando ativação de vias de morte celular e aumento na produção de RL, assim diminuindo a disponibilidade de ATP pela ATP-sintase, na qual em condições fisiológicas é a principal fonte energia cerebral (BAINS AND HALL 2012; GARRY, EZRA et al. 2015). Sendo assim logo após lesão, com a despolarização em massa, juntamente com os danos mitocondriais, o metabolismo cerebral favorece vias glicolíticas (YOSHINO A. et al., 1991). Por outro lado, dependendo do modelo e a gravidade do trauma, 6 horas após lesão algumas regiões cerebrais podem ser atingidas por um hipometabolismo da glicose, podendo perdurar até 10 dias após a lesão (BARKHOUDARIAN et al., 2016). De fato, em um estudo realizado por Vagnozzi R. et al (2007) uma diminuição nas taxas de biomarcadores, tais como, ATP/Adenosina difosfato (ADP), NADH/NAD<sup>+</sup> e N-acetil aspartato foi encontrado em tecidos cerebrais de ratos submetidos a duas lesões por modelo de TCE leve. Além disso, é sabido que repetidas lesões durante esse período de disfunção metabólica cerebral pode resultar em lesões mais graves e levar ao aparecimento de distúrbios cognitivos e psiquiátricos (VAGNOZZI R. et al., 2007; MCCRORY, P et al., 2013 BARKHOUDARIAN et al., 2016). Vale lembrar, que no sistema nervoso central (SNC) a falha da produção energética celular produzida pela mitocôndria é a principal causadora no aumento da geração de ERO/ERN (BOLAÑOS, 2016; DE CARVALHO et al., 2017; GONÇALVES et al). Nesse sentido, as gerações excessivas desses radicais podem estar correlacionadas com o aparecimento de doenças após TCE, como depressão e distúrbios neurodegenerativos (BAJPAI A. et al., 2014). Realmente, em um estudo realizado pelo nosso grupo foi demonstrado um aumento significativo nos níveis EROs em hipocampo de ratos, 24 horas após um único TCE de gravidade moderada (FIORIN F. S. et al., 2016). No entanto, os efeitos acumulativos dos diferentes números de lesões concussivos no aparecimento do comportamento depressivo em camundongos são desconhecidos. Bem como, as implicações na bioenergética mitocôndrias e estresse oxidativo ainda são escassos, principalmente, em modelos que mimetizam as condições humanas dos eventos concussivos relacionado ao esporte, tal como, o modelo Weight Drop (WD), método menos invasivo e a ferramenta do presente trabalho (VAGNOZZI R. et al., 2005; VAGNOZZI R. et al., 2007; MANNIX et al., 2014).

### 1.3 DEPRESSÃO MAIOR

O transtorno depressivo é uma doença debilitante, que de acordo com manual de diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-V) promove nítidas mudanças de humor, como, perda de apetite, prazer, baixa autoestima e sentimento de culpa com duração de pelo menos 2 semanas (VAHIA, 2013). Segundo a organização mundial da saúde (OMS, 2020) mais 264 milhões de pessoas são afetadas mundialmente, além disso, em casos mais severos a depressão acaba por ocasionar um baixo desempenho no trabalho, escola e interações familiares, levando na pior das suposições o indivíduo acometer suicídio. Nesse contexto, é estimado que aproximadamente 50% das 800 mil pessoas que cometem suicídio no mundo estão relacionados com episódios depressivos, bem como, sujeitos diagnosticados com essa doença em algum momento da vida apresentam 20 vezes mais probabilidade de tirar a sua própria vida em comparação com a população no geral (CHESNEY E. et al., 2014; OTTE. C et al., 2016). No Brasil, relatórios estatísticos aferem que o risco para depressão chega a aproximadamente 4,1%, assim representando em torno de 5,5 milhões de brasileiros atingido por essa doença (MUNHOZ T N. et al., 2016). Em adição a esses dados, Bromet E. et al (2011) realizou um estudo com critérios do DSM-IV com 90 mil indivíduos de 18 países, na qual a prevalência dos transtornos depressivos variou de 2,2% no Japão a 10,4% no Brasil, dessa forma, sendo o país com maior incidência segundo a pesquisa.

O transtorno depressivo é um problema de saúde pública alarmante com elevada incidência mundial, na qual a sua fisiopatologia e etiologia não são totalmente compreendidos. Entretanto, a fisiopatologia da depressão contém como principal hipótese a disfunção de neurotransmissores, tais como a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (também chamado de serotonina), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) no cérebro (CAI et al., 2015), que é sustentada desde a década de 50. Nesse sentido, é sabido que a diminuição de 5-HT no SNC está relacionado com ansiedade, obsessões e compulsões, bem como, a deficiência de NE está associado com a redução da energia, falta de atenção e capacidade cognitiva (BRILEY M, e MORET C., 2011). Por outro lado, baixos níveis de DA estão implicados com abaixa motivação, a capacidade de sentir prazer (Anedonia) e recompensa, na quais, tal característica, também tem sido vista em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson (BELUJON P. e GRACE AA, 2017). Dessa maneira, atualmente, existe uma variedade de agentes farmacológicos para intervenção médica no tratamento do transtorno depressivos. Esses medicamentos têm como principal mecanismo de ação



aumentar os níveis de monoaminas na fenda sináptica, bloqueando a recaptação ou degradação de monoaminas, de tal modo que promova seus efeitos neuromoduladores e melhora do quadro depressivo (OTTE. C et al., 2016). Porém, a literatura vem sugerindo o envolvimento de outros fatores no surgimento da depressão, uma vez que, 30% a 50%, dos antidepressivos não alcançam o efeito desejável no paciente na primeira prescrição médica. Nessa linha, mecanismos relacionados com fatores genéticos, psicossociais e disfunções no sistema límbico, tais como, diminuição da matéria cinzenta, redução da densidade de células gliais no córtex pré-frontal e diminuição no volume do hipocampo tem sido descrito (KRISHNAN E NESTLER, 2008; MOORE. A et al., 2018). Além disso, a disfunção no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), o estresse oxidativo, prejuízos mitocondriais e a neuroinflamação também parecem contribuir para o aparecimento de sintomas depressivos (WILLNER. P ET AL., 2013; MOORE. A et al., 2018). Vale salientar, que todos os fatores citados acima não agem de forma isolada, por isso a depressão ainda não está bem esclarecida no que diz a respeito à sua etiologia, assim se tornando objeto de vários estudos para o esclarecimento desse distúrbio psiquiátrico.

#### 1.4 CONCUSSÃO E DEPRESSÃO

Na atualidade, é notório as consequências que uma lesão cerebral pode causar na qualidade de vida de um indivíduo devido as sequelas como, deficiência física, prejuízo cognitivo e os distúrbios de humor. Além disso, elementos como idade, sexo, pré-disposição genética são aspectos que influenciam o resultado final após um TCE. Em relação aos prejuízos emocionais, o qual inclui comportamento agressivo, ansiedade, substâncias de abuso e depressão, são sintomas recorrentes após esse tipo de lesão. No entanto, entre essas possíveis consequências, a depressão é o distúrbio psiquiátrico mais aparente, atingindo 53% dos indivíduos que foram acometidos por uma lesão de moderado a grave. Por outro lado, o aparecimento do comportamento depressivo após lesões concussivas acomete 22% dos indivíduos dentro dos 6 meses após o evento, porém, como já citado anteriormente, as concussões e traumas leves representam de 80-90% dos casos de TCE, o que gera uma preocupação da comunidade científica quanto a esse tipo de lesão. Além disso, o histórico de traumas do tipo concussivo durante a fase da adolescência aumenta 3,3 vezes o aparecimento de depressão na idade adulta, independente do sexo, saúde mental dos pais e status socioeconômicos (CHRISMAN AND RICHARDSON, 2014). Bem como, pessoas com histórico de concussão apresentam duas vezes mais chance de cometer suicídio em relação a população sem

esse tipo de lesão (FRALICK M ET AL., 2019). De fato, uma alta incidência de suicídio tem sido vista em ex-jogadores de futebol americano e veteranos que voltaram da guerra, tal fator, tem sido associado com as repetidas lesões na cabeça que ocorrem em um curto período de tempo nesse ambiente (FRALICK M et al., 2019). Assim, o número de lesões, e o tempo que indivíduo é exposto a um novo evento concussivo são fatores importantes para o aparecimento dos distúrbios psiquiátricos, como também a fase de vida e a gravidade do trauma parecem estar correlacionados (BODNAR C. N et al., 2018). Dessa maneira, na tentativa de diminuir os efeitos acumulativos das lesões repetitivas, tem sido proposta uma janela de vulnerabilidade, sendo assim, caso o indivíduo seja exposto a um segundo trauma sem a resolução bioquímica do primeiro, pode haver um acúmulo do dano cerebral e prolongação da recuperação da lesão (LONGHI L. et al., 2005; BLENNOW K. et al., 2016). Dessa forma, um regime que inclui interrupção das atividades como esporte de contatos, exercícios vigorosos e atividades cognitivas intensas é indicado aos pacientes acometidos pela lesão (THOMAS DG. et al., 2015). No entanto, ainda não é bem definido qual o tempo de descanso adequado para o retorno as atividades, uma vez que, a característica da lesão e o histórico de impactos devem ser levados em conta (BLENNOW K. ET AL., 2016).

No tocante aos tratamentos farmacológicos para depressão após concussão ou TCE, os antidepressivos ainda são os medicamentos de primeira linha (SILVERBERG ND, PANENKA WJ., 2019). Porém, estudos tem indicado que os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (5-HT), como a setralina não demonstraram diferença no tratamento em relação ao grupo placebo na melhora dos sintomas depressivos após TCE (BODNAR CN et al., 2018; FANN JR, et al., 2017). De fato, é sabido que o TCE, independentemente da gravidade, é considerado uma doença heterogênic e possui ampla variedade de mecanismos relacionados ao seu dano secundário. Entre essas, recentemente, as disfunções mitocondriais têm sido implicadas nos agravos após TCE, da mesma forma, em uma ampla gama de quadros patológicos, tais como a depressão, doença de Parkinson e distúrbios de Huntington's (CEBAK et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2018; SHARMA S, AKUNDI RS., 2019). Visto que nas células cerebrais, a mitocôndria é uma organela multifuncional envolvida no fornecimento de energia, bem como, na regulação da plasticidade neuronal, sinapse e crescimento dos corpos dos espinhos dendríticos (MATTSON MP et al., 2008).

## 1.5 MITOCONDRIA

A mitocôndria é uma organela intracelular com membrana dupla, altamente dinâmica e com importantes papéis na célula. Contendo seu próprio genoma, o DNA mitocondrial com características circulares obtém 16.500 pares de bases e 37 genes, assim levando a teoria de que essa organela evoluiu de bactérias aeróbicas, mantendo uma relação simbiótica com células eucarióticas (MILANE L et al., 2015). Essa estrutura celular é responsável por codificar proteínas dos complexos respiratórios que estão localizado na membrana interna mitocondrial (FRIEDMAN JR, NUNNARI J., 2014). Nesse sentido, a sua principal função está conexas com o metabolismo energético celular, no qual tem como função a produção de ATP através da fosforilação oxidativa (LETTS JA, e SAZANOV LA, 2017; KHACHO M. et al., 2019). Na sequência, outras funções também são encontradas na mitocôndria, como biossíntese de aminoácidos e esteroides, beta oxidação de ácidos graxos, geração de ERO e propriedades antioxidantes enzimáticas, bem como, regulação do cálcio e transdução de sinais nas vias de apoptose celular (MILLER W L., 2013; AHN CS, METALLO CM., 2015; MILANE L. et al., 2015). Em suma, essa organela possui um papel crucial na viabilidade celular e alterações em suas funções podem conter efeitos deletérios nos organismos na qual o compõe.

### 1.5.1 Função e bioenergética mitocondrial

A função mitocondrial está diretamente ligada a fosforilação oxidativa que tem como propósito a produção de energia celular na forma de ATP, sendo assim, mais de 90% do conteúdo energético é adquirida através do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna mitocondrial (BRAND MD. et al., 2013; BHATTI JS et al., 2017). Diante do exposto, primeiramente, para dar início ao ciclo do ácido cítrico a acetil-coa é formada pela oxidação de combustíveis orgânicos, tal como, glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos que levam a geração do grupamento acetil (LEHNINGER, T. M et al., 2014). Nesse sentido, o ciclo do ácido cítrico começa com a combinação dos 2 carbonos do acetil-coa com os 4 carbonos do oxaloacetato, decorrência da atividade da enzima citrato-sintase, assim, formando uma molécula de 6 carbonos denominada citrato (LEHNINGER, T. M., 2014; MARTÍNEZ-REYES, I., CHANDEL, N.S., 2020). A energia liberada das oito etapas consecutivas após o início do ciclo é armazenada pelas coenzimas provenientes de nicotinamida e flavina. Com isso, há uma geração dos

transportadores de elétrons, tal como, nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH) e dinucleótido de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>), na qual em suas formas reduzidas irão alcançar a cadeia respiratória mitocondrial. Em relação ao NADH, é produzido pelas descarboxilação oxidativa do ciclo, em que isocitrato é convertido em  $\alpha$ -cetogluturato pela enzima isocitrato-desidrogenase, dessa maneira, subsequentemente o  $\alpha$ -cetogluturato é transformado em succinil-coa pelo complexo  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase, assim gerando 2 moléculas de CO<sub>2</sub> e 2 moléculas de NADH (LEHNINGER, T. M., 2014; MARTÍNEZ-REYES, I., CHANDEL, N.S., 2020). Por fim, a terceira molécula de NADH é produzida na última reação do ciclo, em que a enzima malato-desidrogenase ligado ao NAD<sup>+</sup> catalisa a oxidação de malato a oxaloacetato. Por outro lado, a respeito do FADH<sub>2</sub>, é formado pela oxidação do succinato a fumarato (uma molécula de 4 carbonos), na qual essa reação é carregada pela enzima succinato-desidrogenase. Enfim, essas moléculas em suas formas reduzidas alcançaram os cinco complexos multienzimáticos da cadeia respiratório mitocondrial, sendo eles, o complexo I, II, III, IV e V que estão localizados na membrana interna dessa organela (LETTS JA, e SAZANOV LA, 2017).

Nessa linha, a fosforilação oxidativa mitocondrial, é responsável pela oxidação total de substratos energéticos, como, carboidratos, lipídios e aminoácidos, dessa maneira, levando a formação de ATP, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Esse processo é dado pela teoria quimiosmótica, responsável pela criação de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna mitocondrial, que a partir da atividade da cadeia respiratória, irá acometer no acoplamento da ATP sintase, assim conduzindo a fosforilação do ADP para síntese de ATP (MITCHELL, P., 1961; PAPA S et al., 2012). Nesse contexto, complexo I ou NADH desidrogenase ao receber seu substrato NADH transfere seus elétrons para o átomo central de Ferro-enxofre (Fe-S), em seguida, transferindo os elétrons para forma oxidada da coenzima Q (UQ), logo, ocasionando a sua redução (UQH<sub>2</sub>) (FORMOSA LE. et al., 2018). Além disso, a energia da transferência de elétrons desse processo irá mover quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Por outro lado, os elétrons provenientes do Succinato são transferidos para o FAD (sítio de ligação do succinato), na qual, posteriormente esses elétrons passaram pelo centro Fe-S do complexo II, em direção a coenzima Q, dessa forma, também resultando em sua redução (LETTS JA, e SAZANOV LA, 2017). Contudo, é importante lembrar que o complexo II não contribui diretamente com a geração do gradiente de prótons. Nesse contexto, a UQH<sub>2</sub> produzida nesses dois complexos é submetida a desprotonação, levando a formação do ânion semiquinona (UQH<sup>-</sup>) e, conseqüentemente doando

seus elétrons para o citocromo  $bc_1$  (complexo III), assim, colaborando com a passagem de prótons através da membrana interna da mitocôndria (WANG Y, HEKIMI S., 2016). Em seguida, o citocromo C move-se transportando elétrons para citocromo C oxidase (complexo IV), que por fim, na etapa final da cadeia respiratória esse complexo é responsável pela transferência de elétrons para oxigênio molecular, resultando na formação de  $H_2O$  (LEHNINGER, T. M., 2014). Nessa circunstância, a passagem de elétrons pelos complexos NADH desidrogenase, Citocromo  $bc_1$  e citocromo C oxidase é seguido pelo bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas mitocondrial, no qual irá conter um potencial eletroquímico, devido a diferença da concentração da espécie química ( $H^+$ ), na qual é separada pelas membranas da mitocôndria. Nesse sentido, o gradiente de prótons direciona os mesmos para o compartimento matricial da mitocôndria pela ATP sintase, que utiliza a força prótons- motriz para causar a síntese de ATP (KOWALTOWSKI AJ et al., 2001; PAPA S. et al., 2012). Dessa maneira, as disfunções nesses processos têm contribuindo com o aparecimento de uma ampla variedade de doenças (ARUN S et al., 2016; PEI L, e WALLACE DC. 2018). De fato, a célula necessita de uma grande demanda energética para se manter viva, onde a falta de síntese de ATP pode levar a morte necrótica e acúmulo de EROs, sendo assim, refletindo a sua dependência em relação a mitocôndria. Desse modo, o comprometimento nessa organela está atrelado a vulnerabilidade celular, levando ao aparecimento de diversas doenças neurológicas e metabólicas (BREDESE D. et al., 2006; BHATTI, J. S. et al., 2017). No que tange aos TCEs de moderado a grave a disfunção nessa organela está correlacionada com o comprometimento na cadeia transportadora de elétrons, ocasionado pela sobrecarga de cálcio mitocondrial e danos oxidativos , onde tem sido associado com o desequilíbrio sináptico após esse tipo de lesão (SINGH, I. N et al., 2006; ROBERTSON, CL. et al., 2007; DOBRACHINSKI, F. et al., 2017). Paralelamente, as disfunções mitocondriais no comportamento depressivo em indivíduos está atrelado com a diminuição da síntese de ATP, bem como, em estudos experimentais a inibição dos complexos I, III e IV tem sido descrito após estresse crônico leve (GARDNER, A. et al., 2003; REZIN, GT. et al., 2009; SHARMA S. e AKUNDI RS., 2019). Portanto, em relação a contusões repetitivas na cabeça, não está bem esclarecido o número de concussão para afetar a bioenergética mitocondrial, uma vez que, os prejuízos nesses casos têm sido correlacionados com um certo volume de exposição ao evento

## 1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio metabolizado continuamente pelas mitocôndrias é essencial para a sobrevivência celular. Em que pese, o fluxo de elétrons na fosforilação oxidativa não é um processo totalmente eficiente, por consequência, 0,4 a 4% do oxigênio consumido não é reduzido adequadamente, logo levando a produção de radicais livre ou EROs (DEBATTISTI, V. et al., 2017). Os radicais livres são moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, por outro lado, EROs e ERNs são componentes reativos que não necessariamente possuem desemparelhamento de elétrons (DRÖGE W, 2002). Nessa sequência, a geração excessiva dessas moléculas está intimamente ligada a danificação de proteínas mitocondriais, de membranas, de enzimas e de lesões no DNA (HALLIWELL B. 2012; BHATTI JS. et al., 2017). Outro fator importante, está relacionado com a diferença da demanda energética de cada tecido, na qual o cérebro representa 20% do consumo total do oxigênio, mesmo representando apenas 2 % do peso corporal total, desse jeito, contendo maior suscetibilidade a formação de radicais livres e EROs/ERNs (HALLIWELL, B 2006; GANDHI S. e ABROMOV AY., 2012). Vale lembrar, que a formação dessas espécies de forma balanceada é importante para e regulação do estado redox da célula. Dessa maneira, salienta-se que nem todo estresse oxidativo pode levar a um dano celular, sendo assim, o dano é provocado quando contém um distúrbio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, no qual o sistema de reparo antioxidante endógeno está diminuído em relação a formação de pró-oxidante, radicais livre e EROs/ERNs (Halliwell B e WHITEMAN M, 2004; GANDHI S. e ABROMOV A. Y., 2012).

A fosforilação oxidativa é a principal causadora de EROs, na qual o primeiro radical livre a ser gerado é o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), denominado como ERO primário (DRÖSE S. et al., 2009; DEBATTISTI V et al., 2017). Esse radical é produzido principalmente no complexo I e III da cadeia respiratória mitocondrial, pela qual a coenzima mononucleotídeo de flavina e o ubiquinol reduzem inadequadamente o oxigênio univalente formando o radical livre (NAVARRO A, BOVERIS A., 2007). Dessa forma, a produção de ânion superóxido pode conter vários destinos, levando a interagir com outros compostos formando os chamados EROs secundário (TURRENS JF, 2003; CEBAK J. E. et al., 2016). Nesse sentido, a partir desse EROs, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) uma espécie mais estável e o radical hidroxil ( $-OH^{\cdot}$ ) um composto mais reativo são gerados. Vale lembrar, que o peróxido de hidrogênio é formado pela catalisação da enzima superóxido dismutase (SOD), assim pode ser removido por outros sistemas antioxidantes, como

por exemplo, através da enzima catalase, tioredoxina peroxidase (TPx) e glutatona peroxidase (GPx), resultando na conversão de água (XIONG, Y. 2005; BUETTNER, G. R, 2011; APOSTOLOVA, N. e VICTOR, V. M, 2015). Por outro lado, uma instabilidade nos sistemas antioxidante pode gerar o radical hidroxil, pois, o peróxido de hidrogênio não metabolizado torna-se substrato para a reação de Fenton, na qual essa molécula reage com íons cobre ou ferro nesse processo (BAINS M. e HALL E. 2011; CEBAK J. E. et al., 2016). É importante salientar, que o impacto do trauma pode acometer no rompimento da barreira-hematoencefálica e levar a uma hemorragia do tecido cerebral, no qual esse ambiente pode induzir uma liberação do grupo protético heme, assim gerando excesso de ferro no meio e corroborando com os danos oxidativos no TCE (LIU H. et al., 2013; ZANG M. et al., 2019). Além do mais, o radical ( $O_2^-$ ) pode reagir com as moléculas de óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), nesse contexto gerando a espécie peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), no qual é considerado um potente inibidor do complexo I e III da mitocôndria, assim afetando a respiração mitocondrial e somando na formação de espécies reativas do oxigênio (CEBAK, J. E et al., 2017). Também, peroxinitrito pode causar nitração de resíduos de aminoácidos, tal como, tirosina, triptofano e fenilalanina; que por sua vez, pode ocasionar mudança na conformação de proteínas, atividade enzimáticas e dano no DNA celular (ALVAREZ B. E RADI. R. 2003). Bem como, o SNC apresenta maior suscetibilidade à peroxidação lipídica induzida por radicais livres, uma vez que, as membranas neurais possuem grande quantidade de ácidos graxos, assim a quebra dessas estruturas pode levar a formação de componentes aldeídos, tal como 4-hydroxynonenal (4-HNE), nesse sentido, corroborando com as mudanças conformacionais proteica (SINGH et al., 2006). Em suma, a mensuração dos níveis de EROs após modelos de trauma em animal tem sido bem estabelecida, visto que, há uma íntima relação entre o grau de produção dessas moléculas e a patogênese do TCE (RADI R. 2004; SINGH I. et al., 2006).

## 1.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As defesas antioxidante podem ser definidas como, qual quer substancia que, quando presentes em baixas concentrações em relação com as de um substrato oxidável, adia ou impede a oxidação desse substrato (HALLIWELL B. E GUTTERIDGE J., 2007). As funções antioxidantes têm como princípio reduzir danos oxidativos e mutações do DNA, uma vez que, criaturas aeróbicas que variam de organismo unicelulares a seres humanos estão constantemente expostos a compostos oxidantes ou eletrófilos provenientes das reações enzimáticas endógenas e agentes tóxicos

ambientais (ZHANG H. et al., 2015; PISOSCHI AM. E POP A., 2015). Dessa forma, habitualmente as defesas antioxidantes são divididas em processo enzimáticos e não-enzimáticos. Nesse sentido, em relação aos processos enzimáticos, são sistemas complexos compostos por várias enzimas, sendo as principais, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (BURTTRNER G, 2011; APOSTOLOVA, N.; VICTOR, V. M, 2015). No tocante SOD, é enzima que catalisa a dismutação do radical anion superóxido ( $O_2^-$ ), nesse contexto, gerando uma molécula mais estável como o  $H_2O_2$  e oxigênio molecular (ZHANG H. et al., 2015). Vale lembrar, que há dois tipos dessa enzima, a isoforma compartimentalizada no citosol e no espaço extracelular, na qual é dependente de cobre e zinco (SOD-CuZn ou SOD1/SOD3), e a SOD dependente de manganês (SOD-Mg ou SOD2) que está situada na matriz mitocondrial (ANDREYEV A. et al., 2005). Nessa linha, com formação de  $H_2O_2$ , a CAT e a GPx são enzimas responsáveis por dismutar esse radical em duas moléculas de água, sendo assim, finalizando a desintoxicação das moléculas reativas e protegendo as células contra os danos oxidativos. Importante ressaltar, que a GPx reduz o  $H_2O_2$  utilizando a glutathione reduzida (GSH), assim gerando a sua forma oxidada (GSSG), na qual em seguida, a enzima glutathione redutase é responsável por reciclar a GSSH em duas molécula de GSH, sendo essa última reação dependente de NADPH (RIBAS V et al., 2014; LEHNINGER, T. M et al., 2014). Como citado anteriormente, a integridade desses sistemas é importante, dado que, níveis elevados de  $H_2O_2$  pode interagir com as reações de Feton e Haber-Weiss, dessa forma, culminando em espécies altamente citotóxicas, na qual não há defesas contra essas moléculas (HALLIWELL B. e GUTTERIDGE J., 2007). No que se refere as defesas antioxidantes não enzimáticos, são substancias provenientes da dieta, tais como, vitaminas, minerais e compostos fenólicos (FERRARI CK., 2004; AHMAD P. et al., 2010). Nessa linha, dietas balanceadas e suplementações vitamínicas podem ser importantes para manutenção das respostas aos radicais livres e prevenções de doenças.

Com a evolução as células adquiriram sistemas consideráveis de defesa antioxidantes. Entre essas, o *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) é um importante fator de transcrição de enzimas antioxidantes endógenas que desempenha um papel central na citoproteção em resposta aos danos oxidativo. Nessa linha, o Nrf2 é fator de transcrição das superfamílias de proteínas zíper de leucina, na qual quando ativado se associa com pequenas proteínas Maf no núcleo celular, dessa forma, criando dímeros que se ligam em região com sequencias específicas do DNA, denominados de elemento resposta antioxidante (ARE) (HAYES JD, DINKOVA-



KOSTOVA AT., 2014). Assim, essas proteínas estão associadas com a regulação da expressão em mais de 100 genes relacionado com o estresse oxidativo, entre essas, enzimas de desintoxicação de fase I e II (MA Q., 2013). Importante salientar, que o Nrf2 possui 6 domínios funcionais que são conhecidas como Nrf2-HCH homologias (Neh) dessa forma, variando do Neh1 ao Neh6, logo, cada domínio possui a sua própria função. Nesse sentido, em condições fisiológicas com baixos níveis de espécies reativas o Nrf2 está localizado no citoplasma celular, associado com seu inibidor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), essa ancoragem é realizada pelo domínio Neh2. Vale frisar que, juntamente com o complexo (Keap1) a o um componente proteico denominado *Cul3-based ubiquitin E3 ligase* (Cullin3), o qual é responsável pela ubiquitinação do Nrf2 e subsequente degradação proteossomal (SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M et al., 2015). Entretanto, em condições patológicas como TCE, o aumento de radicais livre causado pelo dano, interage com resíduos de cisteínas presente na Keap1 levando a oxidação dos grupamentos SH presente nesse aminoácido, no qual atua como sensores de estresse oxidativo, dessa maneira, acarretando em uma modificação conformacional nesse complexo proteico, promovendo a liberação do Nrf2 (MILLER, D. M. et al., 2015). Após esse processo de dissociação do complexo inibitório e sua translocação para o núcleo celular, há uma modulação da expressão de genes relacionado a defesas antioxidantes, via interação com as sequências ARE como citado inicialmente. Assim, a regulação transcricional de enzimas tal como, SOD, heme oxigenase 1 (HO-1) e quinona oxidoreductase 1 (NQO1) são realizadas, protegendo as células contra o estresse oxidativo (ALFIERI A, et al., 2011).

No geral, sabe-se que o estresse oxidativo, e disfunções mitocondriais após TCE culminam no aparecimento de distúrbios cognitivos e psiquiátricos. Nessa linha, entre as espécies reativas mais abundantes nesse episódio, está correlacionada com a com formação do radical superóxido pelo metabolismo celular. No entanto, após modelo de TCE de moderado a grave, atividade e a expressão da SOD2 encontra-se diminuída, igualmente, tem sido visto em relação atividade da SOD1, logo comprometendo a resposta antioxidante pós trauma (ANSARI MA. et al., 2008; CARTERI RB. et al., 2019). Dessa forma, atualmente, estudos têm declarado que os mecanismos envolvidos com ativação do Nrf2 pode ser um importante alvo terapêutico para o tratamento dos danos secundários após esse tipo de lesão (DONG W, et al., 2019). De fato, em um recente trabalho realizado pelo nosso grupo, o exercício físico prévio a um TCE induzido pelo modelo LPF aumentou a expressão do Nrf2, na qual foi associado com a diminuição dos níveis de

EROs em córtex de rato após a lesão (DA SILVA FIORIN F. et al., 2016). Além disso, um elegante trabalho que submeteu camundongos knockout para Nrf2 a uma lesão por LPF obteve resposta inadequada das enzimas antioxidante, bem como, um aumento acentuado dos marcadores de danos oxidativos e citocinas pró-inflamatórias interligadas com doenças neurodegenerativa e doenças psiquiátricas, confirmando um papel essencial do Nrf2 em quadros patológicos de TCE (BHOWMICK S. et al., 2019).

Portanto, sabe-se que o TCE pode levar a múltiplas alterações de curto e a longo prazo nos circuitos neuronais. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos após modelo de concussão recorrente. Diante do exposto, determinar qual o volume necessário de lesão para um possível aparecimento do comportamento depressivo em camundongos, bem como, avaliar se há um envolvimento da bioenergética mitocondrial, níveis de EROs e os defesa antioxidante torna-se importante para melhor entendimento dos fenômenos acerca desse cenário.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar se as concussões recorrentes induzem comportamento do tipo depressivo em camundongos, assim como possíveis alterações neuroquímicas envolvidas após esse tipo de lesão.

### 2.2- OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar se diferentes episódios de concussão induzem ao comportamento do tipo depressivo em camundongos.

- Investigar se a biogénética mitocondrial está envolvida no aparecimento do comportamento depressivo induzido por diferentes números de concussões.

- Mensurar se os diferentes números de trauma alteraram expressão das defesas antioxidantes, tal como, Nrf2 e SOD2.

- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio após diferentes volumes de concussão recorrente.

- Determinar atividade da enzima SOD em hipocampo de camundongo, após diferentes números de lesões concussivas.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Journal Pre-proof

The role of mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in depressive behavior in recurrent concussion model in mice

Leandro Severo, Douglas Godinho, Felipe Machado, Diane Hartmann, Michele Rechia Figuera, Félix Alexandre Soares, Ana Flavia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Luiz Fernando Royes



PII: S0024-3205(20)30741-4  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117991>  
Reference: LFS 117991  
To appear in: *Life Sciences*  
Received date: 18 March 2020  
Revised date: 9 June 2020  
Accepted date: 18 June 2020

Please cite this article as: L. Severo, D. Godinho, F. Machado, et al., The role of mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in depressive behavior in recurrent concussion model in mice, *Life Sciences* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117991>

**THE ROLE OF MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS AND OXIDATIVE STRESS IN DEPRESSIVE BEHAVIOR IN RECURRENT CONCUSSION MODEL IN MICE**

Leandro Severo <sup>a,b</sup>, Douglas Godinho <sup>a,b</sup>, Felipe Machado <sup>b</sup>, Diane Hartmann <sup>c</sup>, Michele Rechia Figuera <sup>a,b</sup>, Félix Alexandre Soares <sup>c</sup>, Ana Flavia Furian <sup>d</sup>, Mauro Schneider Oliveira <sup>d</sup>, Luiz Fernando Royes <sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica do Exercício Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900.

<sup>d</sup> Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia-  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

\*Corresponding author: Dr. Luiz Fernando Freire Royes Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas

Centro de Educação Física e Desportos

Universidade Federal de Santa Maria,

97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.

FAX: +55 55 3220 8031 e-mail:

---

**ABSTRACT**

Traumatic brain injury (TBI) is a public health problem in which even though 80 to 90% of cases are considered mild, usually starts a sequence of neurological disorders that can last a considerable time. Most of the research of this injury has been focused on oxidative stress and functional deficits; however, mechanisms that underlie the development of neuropsychiatric disorders remain little researched. Due to this, the present authors decided to investigate whether recurrent concussion protocols alter depressive-like phenotype behavior, and whether mitochondria play an indispensable role in this behavior or not. The experimental data revealed, for the first time, that the present protocol of recurrent concussions (4, 7, and 10 injuries) in mice did not alter immobility time during tail suspension tests (TSTs), but decreased hippocampal mitochondrial respiration and increased expression of proteins such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and superoxide (SOD2). This experimental data suggests that bioenergetic changes elicited by recurrent concussion did not induce depressive-like behavior, but activated the transcription factor of responsive antioxidant elements (ARE) that delay or prevent secondary cascades in this neurological disease.

**Keywords:** Recurrent concussion, depression, mitochondrial bioenergetics, and hippocampus.

## Introduction

Currently, TBI represents a major cause of death and disability [1], characterized by a combination between the primary (caused at impact) and molecular responses over a period of hours to days and years following the injury (secondary damage) [2] [3]. The severity of TBIs can be categorized into mild, moderate, and severe based on the Glasgow Coma Scale (GCS) [4]. In this context, evidence has proposed that 80-90% are classified as mild TBI or concussion and related to contact sport [4]. Additionally, repeated episodes of mild TBI or concussion throughout can change the neurochemistry of the encephalon, which is associated with neuropsychiatric diseases such as depression, and cognitive impairments [5]; [6]; [7]. The production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS/RNS) as well as mitochondrial dysfunction [8], [9], is associated with neuropsychiatric diseases such as major depression [10] [11]. Consequently, a close relationship between the degree of oxidative stress and the pathogenesis of TBI, with enhanced activation of these pathways post-injury [12]; [13], which may be involved in the higher rates of depression following a single moderate/severe injury in clinical cases [14]; [15]. However, the relationship between energy metabolism and redox biochemistry at the mitochondrial level after recurrent concussions is not completely understood.

In the central nervous system (CNS), the increase in ROS/RNS is triggered by the failure of cellular energy production by mitochondria function through of the electron flow and proton-motive force driving mitochondrial adenosine triphosphate ATP synthesis [16]; [17]. After neuronal injury, mitochondrial  $\text{Ca}^{+2}$  uptake induces nitric oxide synthase activation (NOS). Due to high levels of polyunsaturated fatty acids in neuronal membranes, mitochondrial production of nitric oxide (NO), as well as generation of superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) [18, 19] are events involved with lipid peroxidation (LP) and nitration of proteins. Considering that CNSs contain more peroxidation susceptibility than other tissues, the decomposition of these structures can form products —such as 4-hydroxynonenal (4-HNE)— that possess carbonyl functional groups capable of covalently binding to amino acids of cells, creating deleterious effects post-TBI [20]

---

Recently, evidence has suggested that the oxidative stress and functional deficits that occur after TBI are interrelated events [21, 22]. In addition, the oxidative stress-related cascades that result after neuronal injury have been implicated in altered signal transduction. Manipulation of the (Nrf2) pathway can attenuate these multiple pathophysiological processes [23]. This redox state sensitive transcription factor is involved in the transcriptional regulation of many antioxidant genes, including SOD, heme oxygenase 1 (HO-1), and quinone oxidoreductase 1 (NQO1), which protect cells against oxidative stress [24]; [25]. In line with this view, the expression of an Nrf2 increase elicited by previous physical exercise protects against the early oxidative stress damage induced by TBI in the hippocampus [24] as well as, decreased markers of ROS generation in rats' livers [26]. In normal physiological conditions, Nrf2 is localized in the cytoplasm associated with its inhibitor complex, which is responsive for Nrf2 ubiquitination and subsequent proteasomal degradation [23]. After neuronal injury, released free radicals interact with cysteine residues present in the complex, thus causing conformational modifications [27], translocating Nrf2 from the complex into the nucleus, which results in the modulation of antioxidant genes via interaction with (ARE) [28]. It is well known that TBI leads to multiple short and long-term changes in neuronal circuits. With regard to the neurological impairment induced by TBI, considerable evidence has demonstrated that neuropsychiatric disorders elicited by repeated episodes of concussion may, at least in part, result from alterations in surviving neurons and dysfunction of the initial stages after the neuronal injury [11]. However, the mechanisms that underlie the development of neuropsychiatric disorder after TBI remain little understood. Thus, the objectives of the present study were to determine the involvement of mitochondrial bioenergetics, ROS generation, and endogenous anti-oxidation processes (SOD and Nrf2) in depressive-like phenotype behavior in an experimental model of recurrent concussion.



---

## Method

### Animals, ethics statement, and reagents

Forty-six male Swiss mice that were 32 days old (DO) were used for the present study. The animals were housed with five animals per cage (polypropylene, 41 cm × 34 cm × 16 cm L × W × H, 1394 cm<sup>2</sup>) with a floor covered by autoclaved shavings under controlled conditions (12:12-h light-dark cycle, lights turned on at 07:00 a.m; temperature monitored in real time  $24 \pm 1$  °C [Foxlot, Internet of Things, model TWP28]; 55 % relative humidity) on a ventilated rack (Alesco, model FS2), with access to water and food (Puro Lab 22 PB) ad libitum. The present experimental study was approved by the Institutional Ethics Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil and registered under the number 9335180319. The reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Bio-Rad. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

### Chemical reagents

Isoflurane (Cristália, lot: 19090736), sucrose (Exodo, S09697RA, lot: 1907023108), magnesium chloride -MgCl<sub>2</sub>- (Dinâmica, 1055, lot: 67135), potassium phosphate monobasic -KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- (Sigma-Aldrich, P9791 lot: SLBD0340V), bovine serum albumin -BSA- (Sigma-Aldrich, A7906-100g, lot: SLCD4720), glutamate (Sigma, G 1626, Rt), malate (Sigma, M 1000, Rt), pyruvate (Sigma, P 2256), succinate (Sigma, S 2378), antimycin A -AMA- (Sigma, A 8674), oligomycin (Sigma, O 4876), malonate (Sigma, M129-6), adenosine 5'-diphosphate -ADP- (Merck, A2754-1G, lot 3249422), sodium carbonate -Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- (Dinâmica, 1466-1, lot: 106270), epinephrine (Sigma-Aldrich, E4375, lot: BCBW6770), ponceau S (Sigma-Aldrich, P7170-11, lot: SCBR3445V), TBS-T (TRIS, Bio-Rad #162-0719 lot: 009236B), NaCl (Sigma-Aldrich, S7653-1, lot: SLBS2340V), Tween 20, Bio-Rad, 170-6531, lot: L005688A), ECL (Bio-Rad, 1705060, lot: 102031201), carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone -CCCP- (Sigma, 2559-250Mg).

### **Experimental Design**

Initially, the animals were randomly assigned to four groups named "Control group", "Four concussions", "Seven concussions" and "Ten concussions". All the concussions groups began the injuries at 32 DO and finished at 41 DO, being accomplished in a period of ten days. Forty-eight hours (48hs) after the last concussion, the animals were submitted to a behavior test as shown in the timeline below (Figure 1). The control group suffered the same process, except recurrent concussions.

### **Recurrent concussion**

Recurrent concussions (RC) were performed using a weight drop model, based on [29] with modifications. The animals received the concussions throughout a period of ten days. Before the concussion process, the animals received lidocaine topical on their heads [30]. The mice were anesthetized with isoflurane 1 % and placed under aluminum paper with small cuts. Below the aluminum paper, there were sponges to cushion the drop of the animal. Immediately following the anesthesia, the animals were positioned such that the head was placed directly under a hollow guide tube. A trigger was fired, releasing a 54g acrylic weight (2.5cm diameter) which freefell until the animal's head, from a height of 71.1cm (28 inches). A fishing line of 0.30mm supported the weight.

### **Unconsciousness time**

In order to measure the effect of the recurrent concussion model on unconsciousness time, the animals were anesthetized over a period of ten days for 30-45 seconds using isoflurane 1%. After each concussion, the timer was clicked to measure the time that the animal stayed unconscious. Return to consciousness was considered to be when the mouse stayed in a position of supination again. Control group mice underwent anesthesia but not concussive injury. Additionally, the mice that were submitted to four or seven injuries were anesthetized for ten days, thus, the only

Journal Pre-proof

difference being between the number of lesions. The results are available in the supplementary material.

## **Behavior test**

### **Tail-suspension test (TST)**

The TSTs were carried out such as detailed above in the experimental design, at 43 DO. The TST is a mouse behavioral test useful for assessing depression related behaviors [31]. A mouse is suspended by its tail with tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces within a three-walled rectangular compartment (55 cm height X 15 cm width X 11.5 cm depth). This test was held for five minutes, for subsequent analysis. The immobility time was quantified and reported as depressive behavior.

### **High-resolution respirometry (HRR)**

In order to determine the effect of recurrent concussion on mitochondrial functions, immediately following the behavioral test the animals were killed by decapitation for biochemical analysis of the hippocampus. Tissue was gently homogenized on ice in isolation buffer (320 mM sucrose, 10 mM Trizma base, and 2 mM EGTA) using a 5 mL Potter–Elvehjem teflon-glass in accordance with [32]), with some modifications. Cerebral structure homogenates were added to the chamber containing the respiration medium MiR05 (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM K lactobionic acid, 20 mM taurine, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 50 mM sucrose, 0.1 mg/mL fatty acid free BSA). The concentration of tissue homogenate with MiR05 was analyzed at a concentration of 1 mg/ml at a constant temperature of 37 °C, and the rate of oxygen consumption was expressed as oxygen flux in pmols O<sub>2</sub>/ [s \* mg of tissue homogenate], (DatLab software all from OROBOROS Instruments). The oxygraph was calibrated daily, and oxygen concentration was automatically calculated from barometric pressure [16]; [17]

### **Mitochondrial respiration assays**

The abilities of a series of substrates and inhibitors to influence mitochondrial function were assayed as reflected in the difference in respiration states. Mitochondrial bioenergetics in the hippocampus were carried out according to the literature [33]; [34]. Pyruvate, glutamate, malate, and succinate were used as oxidizable substrates. Thus, after signal stabilization, and the addition of endogenous substrates, the complex I-mediated LEAK (CI-LEAK) respiration was determined using 5 mM pyruvate, 5 mM glutamate and 5 mM malate. CI-mediated OXPHOS (CI-OXPHOS) was determined using ADP (1 mM). The convergent electron flow during the maximal OXPHOS respiration (CI + CII-OXPHOS) was determined with substrates of CI and CII (10 mM succinate). For determination of the leak state (measurement of proton conductance by mitochondrial membrane) oligomycin (Omy) (2.5  $\mu$ M) was used—an inhibitor specific to ATP synthase. The capacity of the electron transfer system (ETS) respiration is represented by uncoupled respiration, therefore, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used. CI + CII-mediated ETS respiration (CI + CIIETS) was determined. After, CII-mediated ETS respiration (CII-ETS) was determined with 0.5  $\mu$ M rotenone (Complex I Inhibitor). Additionally, 5 mM malonate (inhibitor of succinate dehydrogenase) and 2.5  $\mu$ M antimycin A (AMA) inhibited complex III were subsequently added, resulting in no mitochondrial respiration. However, in the present study, only the leak state and respiratory control ratios (RCR= CI + CII-OXPHOS/LEAK STATE) were examined to verify the mitochondrial quality control [34].

### **Estimation of ROS production and superoxide dismutase (SOD) activity**

The substrate 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used to measure the intracellular formation of ROS according to [35], with some modifications. Aliquots (5  $\mu$ L) of the hippocampus were added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM), and the incubation was continued for 60 minutes in darkness. The fluorescence was measured using wavelengths of 488 nm for excitation and 525 nm for emission. The SOD activity was measured spectrophotometrically according to the method described by Misra and Fridovich (1972) [36]. This method is based on the capacity of SOD in inhibiting autoxidation of epinephrine. In this assay,

samples of the hippocampus diluted at a ratio of 1:5 were added to the 58 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer pH 10.3, and the enzymatic reaction was initiated by adding 6 mM epinephrine. The color reaction was measured at 480 nm and the results were expressed in units/mg of protein at pH 7 and 30 °C.

### Western blot

Western blot analysis was performed according to [37] with some modifications. Samples of cerebral hippocampus were lysed on ice in RIPA (radio-immunoprecipitation assay) and centrifuged for 20 min at 12,700×g and 4 °C. The protein concentration of each sample was determined by the bicinchoninic acid protein assay (Termo Fisher Scientific). Samples (30µg protein) were then subjected to an 4-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System and equal protein loading was confirmed with Ponceau S solution (Sigma Aldrich - P7170). After specific blocking, the blots were incubated overnight at 4°C with anti-Nrf2 nuclear factor erythroid 2-related factor (SC-722, 1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), SOD-2 antibody (FL-222, sc-30080 1:2000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Mouse anti-β-actin (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was stained as an additional control of the protein loading. After primary antibody incubation, membranes were washed with TBS-T (TBS plus 0.1% Tween 20) two times at room temperature for 10 min and incubated with anti-rabbit (Sigma Aldrich – A6154) or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology – sc-2005) secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:5000), for 2h at room temperature. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence using ECL Western Blotting Substrate (Pierce ECL, BioRad) and the signals were captured with ChemiDoc XRS+ (BioRad). Then the bands were quantified using Image Lab software (Bio-Rad).

### Statistical analysis

Data was expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and was analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

---

## RESULTS

### *The effect of different numbers of repeat concussions on depressive-like phenotype behavior*

In the present study, statistical analysis (one-way ANOVA with Tukey post hoc test) revealed that the present protocol of recurrent concussions did not alter depressive-like phenotype behavior characterized here by immobility time ( $F_{3, 16} = 0.167$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2A). However, the neurochemical data showed that concussions reduced mitochondrial oxygen flux when compared with the control group ( $F_{3, 16} = 4.471$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2C). It is important to note that this effect is not related to the loss of protons by the mitochondrial membrane because the present protocol of recurrent concussions did not alter the mitochondrial leak state ( $F_{3, 14} = 1.058$   $P = 0.3983$ , Fig. 2B). The experimental data also revealed that the present recurrent concussions did not alter SOD activity ( $F_{3, 25} = 1.432$   $P = 0.2571$  Fig. 2F), but increased DCFH-DA oxidation ( $F_{3, 24} = 3.17$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2G) and the expression of the transcription factor of endogenous antioxidant enzymes NRF2 ( $F_{3, 22} = 3.686$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2D) and SOD2 ( $F_{3, 20} = 3.908$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2E).

## Discussion

TBI is one of the most common neurologic disorders that causes disability [38], but there is a need for a reliable and valid diagnostic schema for identifying concussions and diagnosing Persistent Post-Concussive Syndrome, characterized by depression and anxiety. In this context, experimental data from the present study revealed that the present model of recurrent concussion did not alter depressive-like phenotype behavior, but a failure of mitochondrial function and oxidative stress followed by activation of genes (Nrf2) involved in decreasing toxic metabolite accumulation [28] plays an indispensable role in the induction of antioxidant enzymes against secondary damage after a neuronal injury [39]. Notably, the oxidative stress-related cascades after TBI have been implicated in altered signal transduction [40, 41].

In this context, data from the present study also extends the observations of DeKosky and colleagues (2004) by demonstrating that antioxidant responses occur outside the contusion site (lesion penumbra). Thus, it is plausible to propose that the increase in endogenous brain defense (Nrf2) is essential for the development of selective and effective trauma-related therapies [28]. However, the current experiments provide evidence that Persistent Post-Concussive Syndrome elicited by early recurrent concussion does not induce, at least in part, depressive behavior. Furthermore, it is plausible to propose that significant reductions of mitochondrial oxygen are not due to proton conductance elevation across the mitochondrial inner membrane [42] when analyzed six days after neuronal injury.

It is well known that mitochondria are central regulators of cellular metabolism, and normally, the main role of this organelle is production of ATP and buffering of calcium. After TBI, metabolic uncoupling has been well characterized by a single episode, yet mitochondrial bioenergetics during recurrent concussion is poorly defined. The experimental data revealed that mitochondrial bioenergetics are transiently altered after recurrent concussion suggesting that mitochondrial dysfunction could be a determinant of post-injury cellular vulnerability to a repeated impact. In addition, the data showed that a mitochondrial oxygen flux decrease is not due to proton conductance elevation across the mitochondrial inner membrane and mitochondrial permeability transition (mPT). The results corroborate with previous studies of mitochondria isolated from the injured cortex that obtained ETS of reduced capacity and that were reverted by administration of agents that induced mitochondrial uncoupling [43].

According to the free radical theory, a gradual accumulation of the free radicals normally produced in the body underlies the changes in neurological function and may be one of the causes of depressive disorder [44]. In line with this view, the present experiment revealed that mitochondrial bioenergetics altered after recurrent concussion did not induce depressive-like phenotype behavior. Although mitochondria is an important organelle for production of cellular energy [45], it is plausible to propose that mitochondrial dysfunction and depressive behavior happen in separate ways with the appearance of early pathophysiology elicited by recurrent concussion. It is worthy to point out that ROS generation is a necessary and unavoidable consequence of aerobic metabolism, and that the rate of ROS generation in biological tissue is closely

responses to oxidative stress elicited by recurrent concussion reflects the compensatory effect on markers of ROS generation, which translates into the maintenance of mitochondrial homeostasis in this model of recurrent concussion. In fact, the data from the present study showed that ten recurrent concussions did not alter SOD activity, but changes in the profile of oxidative status characterized here by DCFH-DA oxidation, increased the expression of the transcription factor of endogenous antioxidant enzymes NRF2 and SOD 2. The activation of transcription factor NRF2 and the modulation of antioxidant responsive elements (ARE), contain a key role in the induction of enzymes responsible for cellular defense, against oxidative stress [28].

Recently, a considerable body of evidence has demonstrated that oxidative-related cascades resulting from neuronal injury have been implicated in altered signal transduction in the CNS [24, 26]. Although a pre-injury regimen for humans may not be the most effective treatment since the time of injury cannot be predicted [48], data from the present research is of particular interest because it supports the assumption that recurrent concussion-induced bioenergetics changes characterized here by reduced mitochondrial oxygen may not induce depressive-like phenotype behavior, but activation of the transcription factor of antioxidant responsive elements (ARE) in the hippocampus delays or prevents cascades, which lead to long-term disabilities evidenced in this neurological disease.

## **Conclusion**

In summary, the results presented in this study revealed that repeat concussions do not cause a significant difference in immobility in the tail suspension test (TST). However, the protocol of recurrent concussion employed in the present study reduced mitochondrial oxygen flux independent of mitochondrial membrane alteration. The experimental data also showed that recurrent concussion did not alter SOD activity but increased the expression of the transcription factor of endogenous antioxidant enzymes NRF2 and SOD2 (dose dependent). Although the exact molecular signaling pathways have not yet been defined, the experimental data suggests that mitochondrial bioenergetics altered after recurrent concussion did not induce depressive-like



phenotype behavior. However, the development of compensatory responses to oxidative stress after recurrent concussion reflects compensatory effect on markers of ROS generation. The understanding of how recurrent concussions impact CNS physiology is crucial for the design of effective treatments to cope with long-term neurological and psychiatric disorders induced by this neuronal injury.

#### **Declaration of Competing Interest**

All authors declare no competing financial conflicts of interest.

#### **Acknowledgments**

The present work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants: 307382/2017-6). All authors have read and approved the final manuscript.

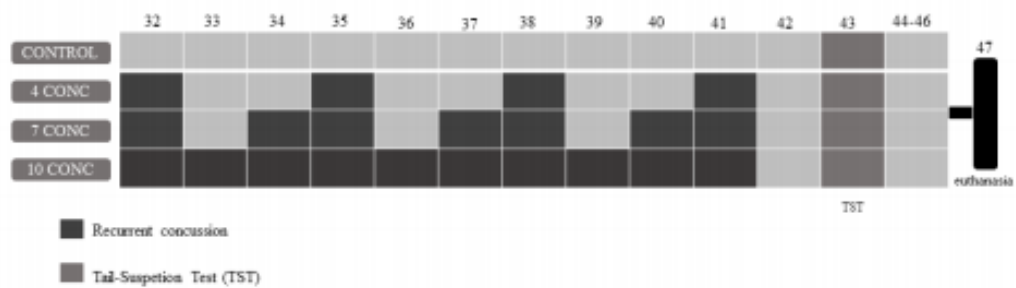
## Reference

1. Gardner, R.C. and K. Yaffe, *Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease*. Mol Cell Neurosci, 2015. **66**(Pt B): p. 75-80 10.1016/j.mcn.2015.03.001
2. Werner, C. and K. Engelhard, *Pathophysiology of traumatic brain injury*. BJA: British Journal of Anaesthesia, 2007. **99**(1): p. 4-9 10.1093/bja/aem131
3. Hunt III, R.F., J.A. Boychuk, and B.N. Smith, *Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy*. Frontiers in cellular neuroscience, 2013. **7**: p. 89 10.3389/fncel.2013.00089
4. Blennow, K., et al., *Traumatic brain injuries*. Nature reviews Disease primers, 2016. **2**(1): p. 1-19 10.1038/nrdp.2016.84
5. Omalu, B.I., et al., *Chronic traumatic encephalopathy (CTE) in a National Football League Player: Case report and emerging medicolegal practice questions*. Journal of forensic nursing, 2010. **6**(1): p. 40-46 10.1111/j.1939-3938.2009.01064.x
6. Max, J.E., et al., *Depression in children and adolescents in the first 6 months after traumatic brain injury*. International Journal of Developmental Neuroscience, 2012. **30**(3): p. 239-245 10.1016/j.ijdevneu.2011.12.005
7. Vargas, G., et al., *Predictors and prevalence of postconcussion depression symptoms in collegiate athletes*. Journal of athletic training, 2015. **50**(3): p. 250-255 10.4085/1062-6050-50.3.02
8. Cebak, J.E., et al., *Phenelzine protects brain mitochondrial function in vitro and in vivo following traumatic brain injury by scavenging the reactive carbonyls 4-hydroxynonenal and acrolein leading to cortical histological neuroprotection*. Journal of neurotrauma, 2017. **34**(7): p. 1302-1317 10.1089/neu.2016.4624
9. Rodriguez, U.A., et al., *Effects of mild blast traumatic brain injury on cerebral vascular, histopathological, and behavioral outcomes in rats*. Journal of neurotrauma, 2018. **35**(2): p. 375-392 10.1089/neu.2017.5256
10. Lipton, M.L., et al., *Robust detection of traumatic axonal injury in individual mild traumatic brain injury patients: intersubject variation, change over time and bidirectional changes in anisotropy*. Brain imaging and behavior, 2012. **6**(2): p. 329-342 10.1007/s11682-012-9175-2
11. Omalu, B.I., et al., *Chronic traumatic encephalopathy, suicides and parasuicides in professional American athletes: the role of the forensic pathologist*. The American journal of forensic medicine and pathology, 2010. **31**(2): p. 130-132 10.1097/PAF.0b013e3181ca7f35
12. Shao, C., et al., *Oxidative stress in head trauma in aging*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **41**(1): p. 77-85 10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.007
13. Ansari, M.A., K.N. Roberts, and S.W. Scheff, *A time course of contusion-induced oxidative stress and synaptic proteins in cortex in a rat model of TBI*. Journal of neurotrauma, 2008. **25**(5): p. 513-526 10.1089/neu.2007.0451

14. Draper, K., J. Ponsford, and M. Schönberger, *Psychosocial and emotional outcomes 10 years following traumatic brain injury*. The Journal of head trauma rehabilitation, 2007. **22**(5): p. 278-287 10.1097/01.HTR.0000290972.63753.a7
  15. Arulsamy, A., F. Corrigan, and L.E. Collins-Praino, *Cognitive and neuropsychiatric impairments vary as a function of injury severity at 12 months post-experimental diffuse traumatic brain injury: Implications for dementia development*. Behavioural brain research, 2019. **365**: p. 66-76 10.1016/j.bbr.2019.02.045
  16. de Carvalho, N.R., et al., *Eugenia uniflora leaf essential oil promotes mitochondrial dysfunction in Drosophila melanogaster through the inhibition of oxidative phosphorylation*. Toxicology research, 2017. **6**(4): p. 526-534 10.1039/c7tx00072c
  17. Gonçalves, D.F., et al., *6-Hydroxydopamine induces different mitochondrial bioenergetics response in brain regions of rat*. Neurotoxicology, 2019. **70**: p. 1-11 10.1016/j.neuro.2018.10.005
  18. Bains, M. and E.D. Hall, *Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2012. **1822**(5): p. 675-684 10.1016/j.bbadis.2011.10.017
  19. Garry, P., et al., *The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment— from bench to bedside*. Experimental neurology, 2015. **263**: p. 235-243 10.1016/j.expneurol.2014.10.017
  20. Singh, I.N., et al., *Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2006. **26**(11): p. 1407-1418 10.1038/sj.jcbfm.9600297
  21. Marklund, N., et al., *Free radical scavenger posttreatment improves functional and morphological outcome after fluid percussion injury in the rat*. Journal of neurotrauma, 2001. **18**(8): p. 821-832 10.1089/089771501316919184
  22. Lima, F.D., et al., *Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress*. Behavioural Brain Research, 2008. **193**(2): p. 306-310 10.1016/j.bbr.2008.05.013
  23. Suzuki, T. and M. Yamamoto, *Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **88**: p. 93-100 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006
  24. 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*. Journal of neurotrauma, 2016. **33**(14): p. 1317-1330 10.1089/neu.2015.4068
  25. Ku, B.M., et al., *Heme oxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity*. Neuroscience letters, 2006. **405**(3): p. 168-171 10.1016/j.neulet.2006.06.052
  26. 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*. The Journal of physiology, 2017. **595**(17): p. 6023-6044 10.1113/JP273933
  27. Miller, M.W. and N. Sadeh, *Traumatic stress, oxidative stress and post-traumatic stress disorder: neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis*. Molecular psychiatry, 2014. **19**(11): p. 1156-1162 10.1038/mp.2014.111
  28. Alfieri, A., et al., *Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke*. The Journal of physiology, 2011. **589**(17): p. 4125-4136 10.1113/jphysiol.2011.210294
  29. Mannix, R., et al., *Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury*. Journal of neurosurgery, 2014. **121**(6): p. 1342-1350 10.3171/2014.7.JNS14272
  30. Mychasiuk, R., A. Farran, and M.J. Esser, *Assessment of an experimental rodent model of pediatric mild traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2014. **31**(8): p. 749-757 10.1089/neu.2013.3132
-

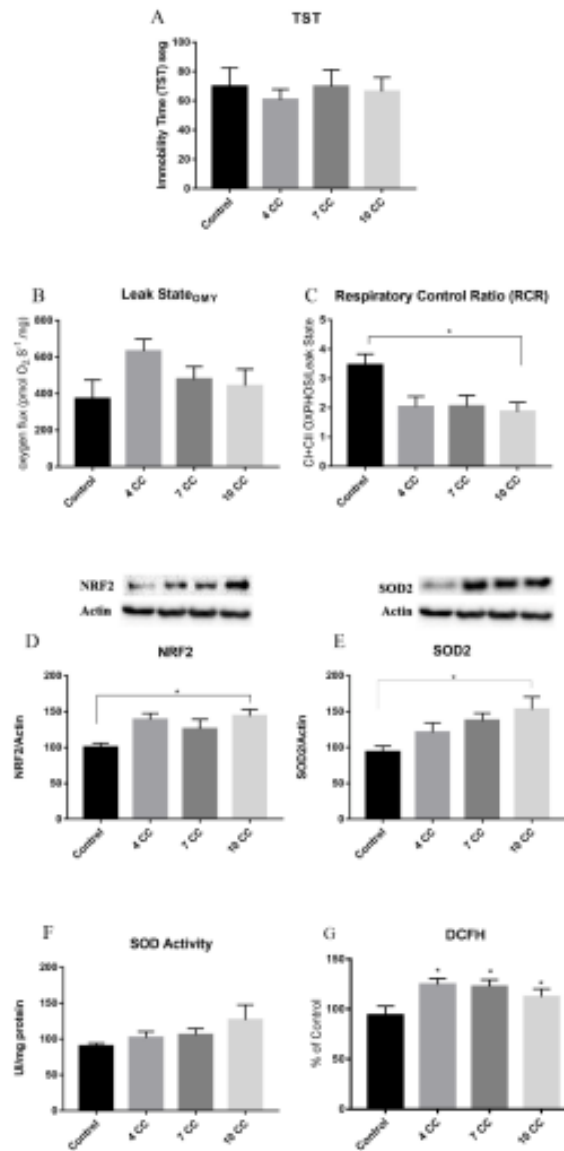
31. Steru, L., et al., *The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice*. *Psychopharmacology*, 1985. **85**(3): p. 367-370 <https://doi.org/10.1007/BF00428203>
  32. Fišar, Z., et al., *Protocols for high-resolution respirometry experiments to test the activity of electron transfer system of pig brain mitochondria*. 2017,
  33. Gnaiger, E., *Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2009. **41**(10): p. 1837-1845 10.1016/j.biocel.2009.03.013
  34. Pesta, D. and E. Gnaiger, *High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle*, in *Mitochondrial bioenergetics*. 2012, Springer. p. 25-5810.1007/978-1-61779-382-0\_3.
  35. Myhre, O., et al., *Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation*. *Biochemical pharmacology*, 2003. **65**(10): p. 1575-1582 10.1016/s0006-2952(03)00083-2
  36. Misra, H.P. and I. Fridovich, *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1972. **247**(10): p. 3170-3175,
  37. Funck, V.R., et al., *Long-term decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit*. *Epilepsy research*, 2014. **108**(10): p. 1705-1710 10.1016/j.eplepsyres.2014.09.025
  38. Fujimoto, S.T., et al., *Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury*. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 2004. **28**(4): p. 365-378 10.1016/j.neubiorev.2004.06.002
  39. Hong, Y., et al., *The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010. **31**(11): p. 1421-1430 10.1038/aps.2010.101
  40. Sullivan, P., et al., *Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2004. **36**(4): p. 353-356 10.1023/B:JOB.0000041767.30992.19
  41. Bayir, H., et al., *Neuronal NOS-mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury*. *Journal of neurochemistry*, 2007. **101**(1): p. 168-181 10.1111/j.1471-4159.2006.04353.x
  42. Kilbaugh, T.J., et al., *Mitochondrial bioenergetic alterations after focal traumatic brain injury in the immature brain*. *Experimental neurology*, 2015. **271**: p. 136-144 10.1016/j.expneurol.2015.05.009
  43. Pandya, J.D., et al., *Post-injury administration of mitochondrial uncouplers increases tissue sparing and improves behavioral outcome following traumatic brain injury in rodents*. *Journal of neurotrauma*, 2007. **24**(5): p. 798-811 10.1089/neu.2006.3673
  44. Choi, J.-E., et al., *Proteomic analysis of hippocampus in a mouse model of depression reveals neuroprotective function of ubiquitin c-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) via stress-induced cysteine oxidative modifications*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018. **17**(9): p. 1803-1823 10.1074/mcp.RA118.000835
  45. Bolaños, J.P., *Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity*. *Journal of neurochemistry*, 2016. **139**: p. 115-125 10.1111/jnc.13486
  46. Toldy, A., et al., *The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain*. *Brain research bulletin*, 2005. **65**(6): p. 487-493 10.1016/j.brainresbull.2005.02.028
  47. Boveris, A. and A. Navarro, *Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008. **44**(2): p. 224-229 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.015
  48. Vaynman, S. and F. Gomez-Pinilla, *License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins*. *Neurorehabilitation and neural repair*, 2005. **19**(4): p. 283-295
-

**Figure 1**



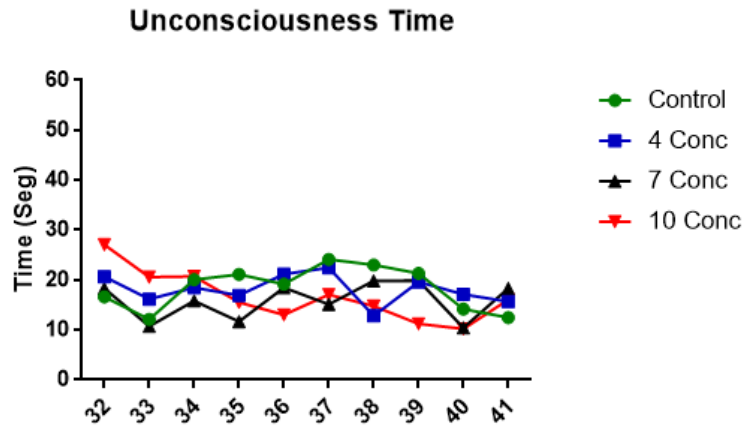
**Figure 1:** All animals received the concussions throughout a period of ten days. The control group experienced the same process except recurrent concussions. The group submitted to four recurrent concussions was exposed to injuries at 32, 35, 38, and 41 DO. The group submitted to seven recurrent concussions was exposed to injuries at 32, 34, 35, 37, 38, 40, and 41 DO. The group submitted to ten recurrent concussions was exposed to injuries daily throughout the ten days. Forty-eight hours (48hs) after the last concussion, the animals were submitted to a behavior test. Six days following the last concussion the animals were euthanized.

Figure 2

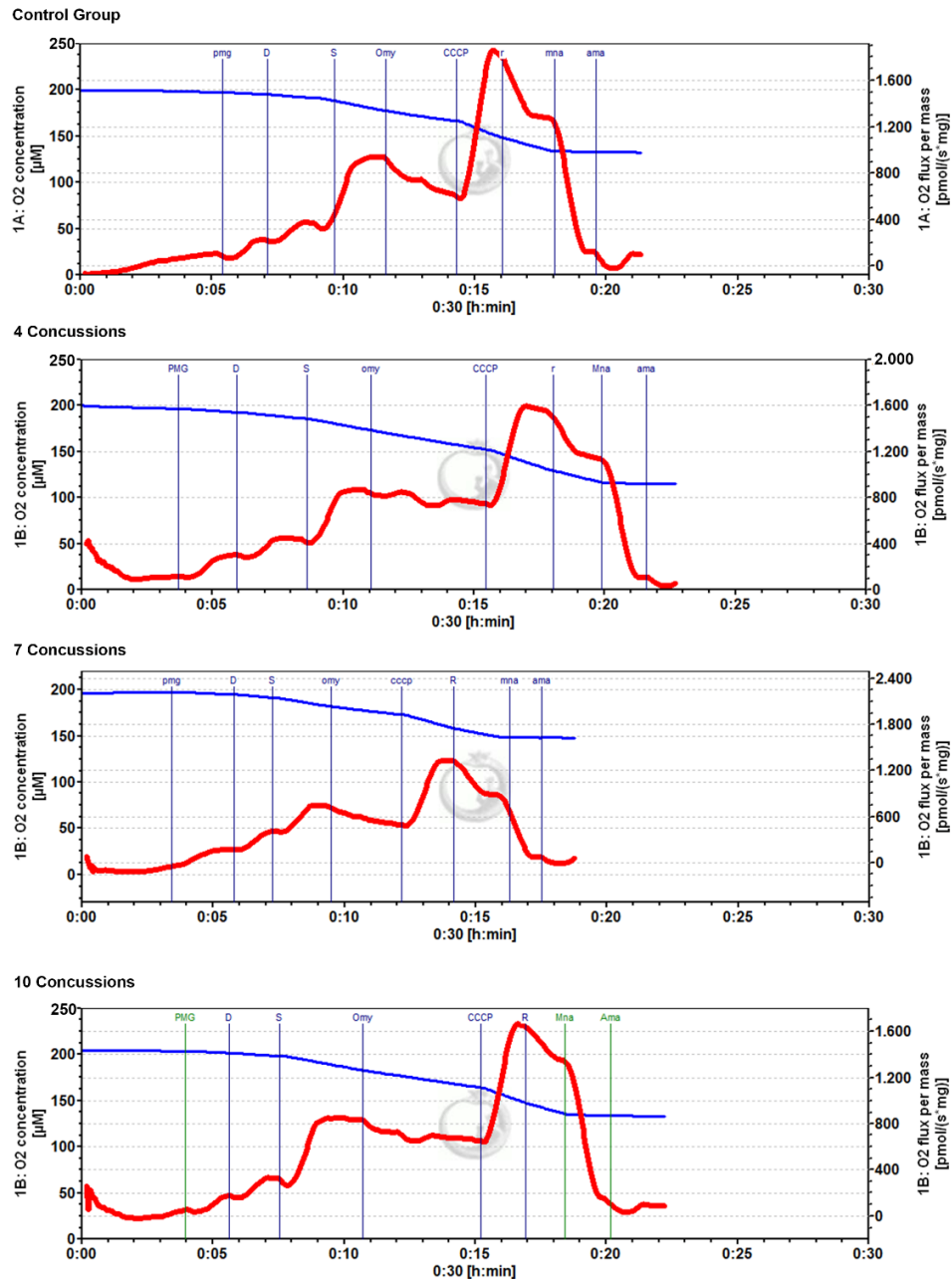


**Figure 2:** Effects of different numbers of repeated concussions on the immobility time in the TST (Fig A) and neurochemical data. The leak state respiration (Leak State<sub>OMY</sub>) (Fig B) was observed in the presence of oligomycin and RCR= (CI+ CII-OXPHOS/Leak State<sub>OMY</sub>) (Fig C). Influence of different numbers of recurrent concussions on protein related with antioxidant defenses. Transcription factor of endogenous antioxidant enzymes NRF2 (Fig D), the SOD2 a scavenger protein (Fig E), SOD activity (F) and DCFH-DA oxidation (G). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM for four to eight animals per group. (\*) indicates statistical difference from control group by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test ( $p < 0.05$ ).

#### 4. MATERIAL SUPPLEMENTAR



**Figure 1:** Unconsciousness time in mice after recurrent concussion as well as the control group after anesthesia. There were no significant difference between the groups compared to control group (Control vs. 4 Conc P Value= >0,9999, Control vs. 7 Conc P Value= 0,0605, Control vs. 10 Conc P Value= 0,4542). Please see supplementary material.



**Figure 2:** Schematic representation of multiple substrate-inhibitor protocols for high-resolution respirometry in homogenates of hippocampus of mice submitted to 4, 7 and 10 injuries. Blue lines: O<sub>2</sub> concentration [ $\mu\text{M}$ ]; red lines: O<sub>2</sub> flux or flow. Mitochondrial function was measured in the presence of Pyruvate + Glutamate + Malate, ADP, succinate, Omy, CCCP, rotenone, malonate and AMA. Though, in the present study was examined only leak state (measured by addition of Omy, that represent of protons conductance by mitochondrial membrane) and Respiratory control ratios ( $\text{RCR} = \text{CI} + \text{CII-OXPPOS}/\text{LEAK STATE}$ ) to verify the mitochondrial quality control. Please see supplementary material.



## 5. DISCUSSÃO

O TCE é uma doença neurológica reconhecida por sua característica devastante na saúde dos indivíduos acometidos por essa lesão, na qual sequelas como, deficiência física, prejuízo cognitivo e os distúrbios de humor são altamente aparente. Nesse sentido, apesar de sua alta heterogeneidade que variam de leve a grave, difuso e focal, 80-90% dos casos de TCEs são considerados concussões ou TCE leve (BLENNOW K. et al. 2016; GRAFF, D. M.; CAPERELL, K. S 2016; MCCRORY, P et al. 2013). Vale destacar que, os números desse tipo de TCE pode ser até três vezes maior devido a sua subnotificação, uma vez que as concussões possuem uma característica própria, em que as mudanças no padrão estrutural de imagem do cérebro e a perda de consciência não são necessariamente presentes, dificultando o diagnóstico (BLENNOW; BRODY et al., 2016; GRAFF, D. M.; CAPERELL, K. S., 2016). Além disso, a concussão possui processos fisiopatológicos complexos, na qual os sintomas normalmente são resolvidos nas primeiras semanas após o trauma (BLENNOW K. et al., 2016). Porém, a somatória das concussões ao longo da vida pode mudar a neuroquímica do encéfalo, levando a atrofia cerebral, disfunções cognitivas e distúrbios psiquiátricos (OMALU, B et al., 2010; THEADOM, A. et al., 2018).

No presente trabalho utilizamos o modelo experimental de lesão por aceleração-desaceleração (Weight drop ou queda livre de peso) com diferentes números de lesão no intuito de elucidar um possível aparecimento do comportamento do tipo depressivo em camundongos. A análise estatística (ANOVA de um fator) revelou que independentemente do número de traumas empregado (4, 7 e 10) não houve diferença significativa no tempo de imobilidade dos animais, assim, sugerindo que o presente protocolo não foi capaz de induzir o comportamento do tipo depressivo em camundongos. Por outro lado, o grupo submetido a 10 concussões recorrentes apresenta uma diminuição significativa no RCR em hipocampo de roedores, indicando uma diminuição na eficiência da bioenergética mitocondrial. No entanto, essa redução no RCR, não foi associada com um aumento do escape de elétrons pelos complexos respiratórios mitocondriais, o qual foi verificado pelo estado “Leak” (vazamento). Além disso, os resultados experimentais demonstram um aumento significativo nos níveis de espécies reativas em todos os grupos submetidos ao protocolo de concussão recorrente, desse modo, sugerindo que o presente modelo de lesão pode levar a uma vulnerabilidade celular pelo acúmulo dessas espécies.

Já está bem estabelecido que a mitocôndria desempenha um papel central no metabolismo cerebral, uma vez que mais de 90% do conteúdo energético é derivada dessa organela, sendo assim, sua ineficiência pode estar atrelada ao aparecimento de distúrbios psiquiátricos (SHARMA S, AKUNDI RS., 2019). Contudo, a diminuição do RCR não foi associada com o comportamento depressivo em nosso estudo. Estes dados experimentais estão de acordo com um recente estudo publicado por Cebak J. et al., (2017) que observou uma diminuição nas taxas de RCR em animais submetidos a traumas de intensidade moderada a grave. Além disso, o trabalho demonstrou que essa diminuição foi impedida nos animais tratados com fenelzina, um potente inibidor da enzima MAO usado para o tratamento da depressão. Além do mais, o aumento das espécies reativas ocasionado pelo nosso modelo de trauma não foi associado com aumento do radical superóxido, visto que essa molécula é produzida principalmente pelo escape de elétrons dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (NAVARRO A, BOVERIS A., 2007), e os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa no estado leak e atividade da SOD total. Neste contexto, é apropriado propor que a disfunção mitocondrial e o comportamento depressivo após episódios concussivos acontecem de maneiras distintas em camundongos. No entanto, os prejuízos mitocondriais podem ser fator de risco para desenvolvimento de distúrbios neurológicos futuros (ARUM S. et al., 2016). Dessa forma, trabalhos que analisem esse comportamento cronicamente devem ser realizados, para determinar se esse efeito no RCR mitocondrial antecede a um suposto comportamento depressivo em animais submetidos ao modelo Weight drop.

Atualmente, uma ampla variedade de estudos tem demonstrado um papel importante do Nrf2 após TCE, uma vez que sua ativação pode resultar no aumento de enzimas antioxidantes, contra o aumento dos danos oxidativos ocasionado por esse tipo de lesão. No entanto, após as concussões recorrentes, a ativação dessa proteína endógena é pouco esclarecida. Nesse contexto, os nossos dados revelaram um aumento significativo na expressão do Nrf2 somente no grupo submetido a repetição de 10 concussões, apesar de todos os animais lesionados obterem um aumento significativo nos marcadores de espécies reativas. Sendo assim, esses resultados apontam que o aumento da sinalização do Nrf2 é dependente de dose, onde a elevação do número de lesões resultou em respostas acentuadas desse fator transcrição. Em adição, mesmo o Nrf2 sendo um fator chave para aumento das defesas antioxidantes (HONG Y. et al., 2010), somente o seu acúmulo não é suficiente para promover o papel neuroprotetor em eventos patológicos (RAMSEY CP et al., 2007; DONG W. et al., 2018). Dessa forma, os presentes autores mostraram um aumento

significativo da enzima antioxidante mitocondrial SOD2 no grupo submetido a 10 concussões recorrentes, indicando uma modulação do sistema Nrf2-ARE contra o aumento do estresse oxidativo. Além disso, cabe salientar que o limiar de lesão para essas alterações foi atribuído aos animais submetidos a 10 episódios concussivos.

Em relação a expressão da SOD2 em modelos experimentais de TCE, uma resposta inversamente proporcional à gravidade tem sido descrita, sendo encontrada uma diminuição significativa nessa proteína antioxidante mitocondrial após a lesão, o que pode dificultar as respostas a um dano oxidativo, podendo levar a formação de espécies mais reativas e citotóxicas (CARTERI R. et al., 2018; BHOWMICK S. et al., 2019). Todavia, é importante ressaltar que, no presente trabalho, os níveis de EROs foram consideravelmente maiores em animais lesionados. Dessa forma, é apropriado propor a participação de outros mecanismos relacionados com o aumento desses agentes oxidantes, além da cadeia respiratória mitocondrial. Sendo assim, mais esforços científicos devem ser realizados para melhor elucidar se repetidas lesões induzidas pelo modelo Weight Drop são capazes de levar ao comportamento do tipo depressivo em outros testes comportamentais, bem como, verificar o envolvimento de outras enzimas antioxidantes e formadoras de espécies citotóxicas, para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos após esse tipo de lesão.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados do presente estudo revelaram que os diferentes números de lesão não alteraram significativamente o tempo de imobilidade no TSC. Porém, o protocolo de concussão recorrente empregado reduziu o fluxo de oxigênio na mitocôndria, independente da alteração do escape de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, os dados estatísticos também demonstraram que os traumas provocados pelo modelo utilizado no presente trabalho elevaram os níveis das espécies reativas, mas não alteraram a atividade da SOD. Entretanto, as injúrias induziram a um aumento na expressão de proteínas antioxidante, tal como, NRF2 e SOD2, de forma dependente de dose. Portanto, apesar das vias de sinalização molecular ainda não terem sido definidas, os dados experimentais sugerem que as mudanças na bioenergética mitocondrial não induziram o comportamento do tipo depressivo. Todavia, o desenvolvimento de respostas compensatórias ao estresse oxidativo após as concussões recorrentes foram parcialmente relatadas. Por fim, a compreensão de como as concussões recorrentes afetam a fisiologia do SNC é crucial para o desenvolvimento de tratamentos efetivos de doenças psiquiátricas e neurológicas induzida por essa lesão, sendo assim, tornando-se necessário que mais estudos sejam feitos, a fim de ajudar na compreensão desse evento.

## 7. PERSPECTIVA

Como citado anteriormente, pessoas acometidas pelo TCE apresentam maior susceptibilidade ao aparecimento de doenças psiquiátricas e cognitivas, bem como, segundo estudos correlacionais recentes, indivíduos que possuem histórico de concussões são 2 vezes mais propensos a cometer suicídio (BLENNOW; BRODY et al., 2016; FRALICK; SY et al., 2019; OMALU, BENNET I; BAILES, JULIAN et al., 2010). Nesse sentido, interessa ao nosso grupo desenvolver estudos futuros, com fármacos que induzem os animais ao fenótipo do tipo depressivo, objetivando investigar se o modelo de concussões recorrentes induzidas por queda livre de peso (weight drop) é capaz de aumentar a susceptibilidade ao aparecimento desse comportamento.

A literatura corrobora que maioria das concussões ocorrem durante a prática de esportes de contato, sendo esse um ambiente onde os eventos concussivos podem acometer o mesmo indivíduo mais de uma vez, em um curto período de tempo (MULLALLY, 2017). Levando esse fator em conta, é bem estabelecido os benefícios que os diferentes tipos de exercício provocam no cérebro dos seus praticantes (DE ALMEIDA et al., 2013). Por outro lado, mesmo que benéfico à longo prazo, agudamente, quanto maior a intensidade do exercício maior é a produção de citocinas pró-inflamatórias e EROS (COSTA et al., 2018; RADAK et al., 2016). Sendo assim, os efeitos do exercício físico de alta intensidade podem exacerbar os efeitos da concussão durante à prática esportiva, podendo levar a uma exaustão das defesas antioxidante, e a potencialização dos danos oxidativos.

Como mostrado nesse primeiro manuscrito, as concussões recorrentes foram capazes de alterar, de acordo com o número de lesões, a bioenergética mitocondrial e o estresse oxidativo no hipocampo de camundongos jovens. Efeitos compensatórios relacionados as defesas antioxidantes, marcadas pela expressão das proteínas NRF2 e SOD2, foram observados. Sendo assim, supomos que o exercício físico de alta intensidade praticado logo antes do evento concussivo poderá exacerbar esse dano, podendo levar um desbalanço nas defesas antioxidantes e consequentemente a prejuízos comportamentais relacionado a doenças psiquiátricas. Por fim, mais estudos se fazem necessários para melhor elucidar os possíveis efeitos das concussões recorrentes concomitantes com a prática de exercício físico de alta intensidade no aparecimento de distúrbios psiquiátricos, assim se tornando objeto de estudo futuro no nosso grupo.

## 8. REFERENCIAS

ANDRIESEN TM, JACOBS B, VOS PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. **J Cell Mol Med.** 2010;14(10):2381-2392. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x

ALFIERI A, SRIVASTAVA S, SIOW RC, MODO M, FRASER PA, MANN GE. Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. **J Physiol.** 2011 Sep 1;589(17):4125-36. doi: 10.1113/jphysiol.2011.210294. Epub 2011 Jun 6. PMID: 21646410; PMCID: PMC3180573.

ALVAREZ B, RADIR. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):295-311. doi: 10.1007/s00726-003-0018-8. Epub 2003 Sep 26. PMID: 14661092.

AHMAD P, JALEEL CA, SALEM MA, NABI G, SHARMA S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Crit Rev Biotechnol.** 2010 Sep;30(3):161-75. doi: 10.3109/07388550903524243. PMID: 20214435

ANDREYEV, A. YU, YU E. KUSHNAREVA, AND A. A. STARKOV. "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." *Biochemistry (Moscow)* 70.2 (2005): 200-214.

ARUN S, LIU L, DONMEZ G. Mitochondrial Biology and Neurological Diseases. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(2):143-154. doi:10.2174/1570159x13666150703154541

AHN CS, METALLO CM. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. **Cancer Metab.** 2015 Jan 25;3(1):1. doi: 10.1186/s40170-015-0128-2. PMID: 25621173; PMCID: PMC4305394.

APOSTOLOVA, N.; VICTOR, V. M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 8, p. 686-729, 2015. ISSN 1557-7716/1523-0864.

ANDERSEN SL, TEICHER MH. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. **Trends Neurosci.** 2008 Apr;31(4):183-91. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.004. Epub 2008 Mar 10. PMID: 18329735.

ALAO T, WASEEM M. Penetrating Head Trauma. 2020 Aug 11. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; 2020 Jan-. PMID: 29083824.

JORDAN BD. The clinical spectrum of sport-related traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**. 2013 Apr;9(4):222-30. doi: 10.1038/nrneurol.2013.33. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23478462.

BLENNOW, K.; BRODY, D. L.; KOCHANNEK, P. M.; LEVIN, H. et al. Traumatic brain injuries. **Nature reviews Disease primers**, 2, n. 1, p. 1-19, 2016.

BRAND MD, ORR AL, PEREVOSHCHIKOVA IV, QUINLAN CL. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. **Br J Dermatol**. 2013;169 Suppl 2(0 2):1-8. doi:10.1111/bjd.12208

BARRIO, J. R. et al. In vivo characterization of chronic traumatic encephalopathy using [F-18]FDDNP PET **brain imaging.Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 16, p.E2039-47, Apr 21 2015.

BHATTI JS, BHATTI GK, REDDY PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. 2017 May;1863(5):1066-1077. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.010. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27836629; PMCID: PMC5423868.

BOLAÑOS, J. P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. **Journal of neurochemistry**, 139, p. 115-125, 2016.

BAINS M.; HALL E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p. 675–684, 2012.

BROMET, E., ANDRADE, L.H., HWANG, I. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Med** 9, 90 (2011). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-90>

BODNAR CN, MORGANTI JM, BACHSTETTER AD. Depression following a traumatic brain injury: uncovering cytokine dysregulation as a pathogenic mechanism. **Neural Regen Res**. 2018;13(10):1693-1704. doi:10.4103/1673-5374.238604

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 341-346, 2011. ISSN 1875-5992

BARKHOUDARIAN, G.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. The molecular pathophysiology of concussive brain injury—an update. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, 27, n. 2, p. 373-393, 2016.

BELUJON P, e GRACE AA. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;20(12):1036-1046. doi:10.1093/ijnp/pyx056.

BAJPAI A, VERMA AK, SRIVASTAVA M, SRIVASTAVA R. Oxidative stress and major depression. **J Clin Diagn Res.** 2014;8(12):CC04-CC7. doi:10.7860/JCDR/2014/10258.5292

BHOWMICK S, D'MELLO V, CARUSO D, ABDUL-MUNEER PM. Traumatic brain injury-induced downregulation of Nrf2 activates inflammatory response and apoptotic cell death. **J Mol Med (Berl).** 2019 Dec;97(12):1627-1641. doi: 10.1007/s00109-019-01851-4. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31758217.

BRILEY M, MORET C. Improvement of social adaptation in depression with serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. **Neuropsychiatr Dis Treat.** 2010 Oct 5;6:647-55. doi: 10.2147/NDT.S13171. PMID: 20957125; PMCID: PMC2951748.

CRESPO C A. Concussões no país do futebol e o silêncio sobre elas. **Psychiatry on lineBrasil.** Vol.16 n 11 2011. Disponível em <http://www.polbr.med.br/ano11/art1111.php> acesso em: 2 set, 2020

CAI, S., S. HUANG AND W. HAO. "New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings." **Neurosci Bull** 31(1): 61-74, 2015.

COUPLAND C, HILL T, MORRIS R, MOORE M, ARTHUR A, HIPPISEY-COX J. Antidepressant use and risk of adverse outcomes in people aged 20-64 years: cohort study using a primary care database. **BMC Med.** 2018 Mar 8;16(1):36. doi: 10.1186/s12916-018-1022-x. PMID: 29514662; PMCID: PMC5842559.



CEBAK, J. E.; SINGH, I. N.; HILL, R. L.; WANG, J. A. et al. Phenelzine protects brain mitochondrial function in vitro and in vivo following traumatic brain injury by scavenging the reactive carbonyls 4-hydroxynonenal and acrolein leading to cortical histological neuroprotection. **Journal of neurotrauma**, 34, n. 7, p. 1302-1317, 2017.

CHRISMAN SP, RICHARDSON LP. Prevalence of diagnosed depression in adolescents with history of concussion. **J Adolesc Health**. 2014 May;54(5):582-6. doi: 10.1016/j.jadohealth.2013.10.006. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24355628; PMCID: PMC3999295.

DA SILVA, TH et al . Influence of severity of traumatic brain injury at hospital admission on clinical outcomes. **Fisioter. Pesqui.**, São Paulo , v. 25, n. 1, p. 3-8, Mar. 2018 <https://doi.org/10.1590/1809-2950/1701922501201>

DA SILVA FIORIN F, DE OLIVEIRA FERREIRA AP, RIBEIRO LR, SILVA LF, DE CASTRO MR, 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 Jul 15;33(14):1317-30. doi: 10.1089/neu.2015.4068. Epub 2016 Apr 15. PMID: 26651029.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**. 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.

DEBATTISTI V, GERENCSEK AA, SAOTOME M, DAS S, HAJNÓCZKY G. ROS Control Mitochondrial Motility through p38 and the Motor Adaptor Miro/Trak. **Cell Rep**. 2017 Nov 7;21(6):1667-1680. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.060. PMID: 29117569; PMCID: PMC5710826.

DOBRACHINSKI F, DA ROSA GERBATIN R, SARTORI G, FERREIRA MARQUES N, ZEMOLIN AP, et al. Regulation of Mitochondrial Function and Glutamatergic System Are the Target of Guanosine Effect in Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**. 2017 Apr 1;34(7):1318-1328. doi: 10.1089/neu.2016.4563. Epub 2017 Jan 13. PMID: 27931151.

DE ALMEIDA, C. E. R.; DE SOUSA FILHO, J. L.; DOURADO, J. C.; GONTIJO, P. A. M. et al. Traumatic brain injury epidemiology in Brazil. **World neurosurgery**, 87, p. 540-547, 2016.

DEWAN MC, RATTANI A, GUPTA S, BATICULON RE, HUNG YC. et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. **J Neurosurg**. 2018 Apr 1:1-18. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352. Epub ahead of print. PMID: 29701556.

DONG W, SUN Y, CHENG H, YANG B, WANG L, et al. Dynamic cell type-specific expression of Nrf2 after traumatic brain injury in mice. **Eur J Neurosci**. 2019 Jul;50(2):1981-1993. doi: 10.1111/ejn.14399. Epub 2019 Apr 23. PMID: 30828870.

ELOIA, S. C.; ELOIA, S. M. C.; DE SALES, E. N. B. G.; SOUSA, S. M. M. et al. Análise epidemiológica das hospitalizações por trauma crânioencefálico em um hospital de ensino. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, 10, n. 2, 2011.

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

CHESNEY E, GOODWIN GM, FAZEL S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. **World Psychiatry**. 2014 Jun;13(2):153-60. doi: 10.1002/wps.20128. PMID: 24890068; PMCID: PMC4102288.

FAUL M, XU L, WALD MM, CORONADO VG. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002–2006. Atlanta (GA): **Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control**; 2010.

FORMOSA LE, DIBLEY MG, STROUD DA, RYAN MT. Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. **Semin Cell Dev Biol**. 2018 Apr;76:154-162. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.011. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28797839.

FADEN AI, DEMEDIUK P, PANTER SS, VINK R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science**. 1989 May 19;244(4906):798-800. doi: 10.1126/science.2567056. PMID: 2567056.

FANN JR, BOMBARDIER CH, TEMKIN N, ESSELMAN P, WARMS C, BARBER J, DIKMEN S. Sertraline for Major Depression During the Year Following Traumatic Brain Injury: A Randomized Controlled Trial. **J Head Trauma Rehabil**. 2017 Sep/Oct;32(5):332-342. doi: 10.1097/HTR.0000000000000322. PMID: 28520672; PMCID: PMC5593759.

FERRARI, Carlos KB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, v. 5, n. 5, p. 275-289, 2004.

FRIEDMAN JR, NUNNARI J. Mitochondrial form and function. **Nature**. 2014 Jan 16;505(7483):335-43. doi: 10.1038/nature12985. PMID: 24429632; PMCID: PMC4075653.

FRALICK M, SY E, HASSAN A, BURKE MJ, MOSTOFSKY E, KARSIES T. Association of Concussion With the Risk of Suicide: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Neurol**. 2019;76(2):144-151. doi:10.1001/jamaneurol.2018.3487

GRAFF, D. M.; CAPERELL, K. S. Concussion Management in the Classroom. **J Child Neurol**, 31, n. 14, p. 1569-1574, Dec 2016.

GURKOFF GG, GIZA CC, SHIN D, AUVIN S, SANKAR R, HOVDA DA. Acute neuroprotection to pilocarpine-induced seizures is not sustained after traumatic brain injury in the developing rat. **Neuroscience**. 2009;164(2):862-876. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.021

GAMARO GD, STRECK EL, MATTÉ C, PREDIGER ME, WYSE AT, DALMAZ C. Reduction of hippocampal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res**. 2003 Sep;28(9):1339-44. doi: 10.1023/a:1024988113978. PMID: 12938855.

GARDNER A, JOHANSSON A, WIBOM R, NENNESMO I, VON DÖBELN U, et al . Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. **J Affect Disord**. 2003 Sep;76(1-3):55-68. doi: 10.1016/s0165-0327(02)00067-8. PMID: 12943934.

GARRY, P.; EZRA, M.; ROWLAND, M.; WESTBROOK, J. et al. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—from bench to bedside. **Experimental neurology**, 263, p. 235-243, 2015.

GONÇALVES, D. F.; COURTES, A. A.; HARTMANN, D. D.; DA ROSA, P. C. *et al.* 6-Hydroxydopamine induces different mitochondrial bioenergetics response in brain regions of rat. **Neurotoxicology**, 70, p. 1-11, 2019.

GANDHI S, ABRAMOV AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**. 2012;2012:428010. doi: 10.1155/2012/428010. Epub 2012 May 16. PMID: 22685618; PMCID: PMC3362933.

GENNARELLI, T. A., & GRAHAM, D. I. Neuropathology. In J. M. Silver, T. W. McAllister, & S. C. Yudofsky (Eds.), *Traumatic brain injury* (pp. 27–50). Arlington, VA: **American Psychiatric Publishing, Inc.** 2005.

GARDNER, R. C.; YAFFE, K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 66, p. 75-80, 2015.

GERBATIN RDR, CASSOL G, DOBRACHINSKI F, FERREIRA APO, et al. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. *Mol Neurobiol*. 2017 Dec;54(10):7585-7596. doi: 10.1007/s12035-016-0238-z. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27830534.

GENTRY LR, GODERSKY JC, THOMPSON B, DUNN VD. Prospective comparative study of intermediate-field MR and CT in the evaluation of closed head trauma. **AJR Am J Roentgenol**. 1988 Mar;150(3):673-82. doi: 10.2214/ajr.150.3.673. PMID: 3257625.

HAWRYLUK GW, MANLEY GT. Classification of traumatic brain injury: past, present, and future. **Handb Clin Neurol**. 2015;127:15-21. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00002-7. PMID: 25702207.

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**. 2012 May;70(5):257-65. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x. PMID: 22537212.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**. 2006;141(2):312-322. doi:10.1104/pp.106.077073

HALLIWELL, BARRY; WHITEMAN, MATTHEW. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th Edition, Oxford University Press, New York.

Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):199-218. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002. Epub 2014 Mar 16. PMID: 24647116.

IKONOMIDOU C, KAINDL AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Apr 15;14(8):1535-50. doi: 10.1089/ars.2010.3581. Epub 2011 Feb 20. PMID: 20919934.

KRISHNAN V, NESTLER EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):894-902. doi: 10.1038/nature07455. PMID: 18923511; PMCID: PMC2721780.

DE KLOET ER, JOËLS M, HOLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jun;6(6):463-75. doi: 10.1038/nrn1683. PMID: 15891777.

KHACHO M, HARRIS R, SLACK RS. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nat Rev Neurosci*. 2019 Jan;20(1):34-48. doi: 10.1038/s41583-018-0091-3. PMID: 30464208.

KOWALTOWSKI AJ, CASTILHO RF, VERCESI AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1-2):12-5. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x. PMID: 11322939.

KATZ DI, COHEN SI, ALEXANDER MP. Mild traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015;127:131-56. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00009-X. PMID: 25702214.

KATZ MM, TEKELL JL, BOWDEN CL, BRANNAN S, HOUSTON JP, BERMAN N, FRAZER A. Onset and early behavioral effects of pharmacologically different antidepressants and placebo in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Mar;29(3):566-79. doi: 10.1038/sj.npp.1300341. PMID: 14627997.

KIRALY DD, HORN SR, VAN DAM NT, COSTI S, et al. Altered peripheral immune profiles in treatment-resistant depression: response to ketamine and prediction of treatment outcome. *Transl Psychiatry*. 2017 Mar 21;7(3):e1065. doi: 10.1038/tp.2017.31. PMID: 28323284; PMCID: PMC5416674.

KATO M, SERRETTI A. Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2010 May;15(5):473-500. doi: 10.1038/mp.2008.116. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18982004.

LANGLOIS JA, RUTLAND-BROWN W, THOMAS KE. The incidence of traumatic brain injury among children in the United States: differences by race. *J Head Trauma Rehabil*. 2005 May-Jun;20(3):229-38. doi: 10.1097/00001199-200505000-00006. PMID: 15908823.

LONGHI L, SAATMAN KE, FUJIMOTO S, RAGHUPATHI R, MEANEY DF, DAVIS J, et al. Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury. *Neurosurgery*. 2005 Feb;56(2):364-74; discussion 364-74. doi: 10.1227/01.neu.0000149008.73513.44. PMID: 15670384.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

LOTRICH FE, RABINOVITZ M, GIRONDA P, POLLOCK BG. Depression following pegylated interferon-alpha: characteristics and vulnerability. *J Psychosom Res*. 2007;63(2):131-135. doi:10.1016/j.jpsychores.2007.05.013

LETTS JA, SAZANOV LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Oct 5;24(10):800-808. doi: 10.1038/nsmb.3460. PMID: 28981073.

LIU W, GE T, LENG Y, PAN Z, FAN J, YANG W, CUI R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*. 2017;2017:6871089. doi: 10.1155/2017/6871089. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28246558; PMCID: PMC5299163.

LIN YT, YU YL, HONG WC, YEH TS, CHEN TC, CHEN JC. NPFFR2 Activates the HPA Axis and Induces Anxiogenic Effects in Rodents. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 21;18(8):1810. doi: 10.3390/ijms18081810. PMID: 28825666; PMCID: PMC5578197

MAAS AI, MENON DK, STEYERBERG EW, CITERIO G, et al. Collaborative European neurotrauma effectiveness research in traumatic brain injury (CENTER-TBI): a prospective longitudinal observational study. *Neurosurgery* (2015) 76:67–80. doi:10.1227/NEU.0000000000000575

MA Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2013;53:401-426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320

MITCHELL, PETER. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144-148, 1961.

MARTÍNEZ-REYES, I., CHANDEL, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nat Commun** 11, 102 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

MYINT AM, SCHWARZ MJ, MÜLLER N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. **J Neural Transm** (Vienna). 2012 Feb;119(2):245-51. doi: 10.1007/s00702-011-0741-3. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22139324.

MILANE L, TRIVEDI M, SINGH A, TALEKAR M, AMIJI M. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. **J Control Release.** 2015 Jun 10;207:40-58. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.036. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25841699.

MARAR, M.; MCILVAIN, N. M.; FIELDS, S. K.; COMSTOCK, R. D. Epidemiology of concussions among United States high school athletes in 20 sports. **The American journal of sports medicine**, 40, n. 4, p. 747-755, 2012.

MARTINS, H. S.; DAMASCENO, M.C de T.; AWADA, S. B. Pronto-Socorro: Conduitas do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Barueri **Manole.** 2008

MILLER AH, RAISON CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nat Rev Immunol.** 2016 Jan;16(1):22-34. doi: 10.1038/nri.2015.5. PMID: 26711676; PMCID: PMC5542678

MILLER, D. M.; SINGH, I. N.; WANG, J. A.; HALL, E. D. Nrf2–ARE activator carnosic acid decreases mitochondrial dysfunction, oxidative damage and neuronal cytoskeletal degradation following traumatic brain injury in mice. **Experimental neurology**, 264, p. 103-110, 2015.

MAGALHÃES, A. L. G.; SOUZA, L. C. d.; FALEIRO, R. M.; TEIXEIRA, A. L. et al. Epidemiologia do traumatismo cranioencefálico no Brasil. **Rev Bras Neurol**, 53, n. 2, p. 15-22, 2017.

MANNIX, R.; BERGLASS, J.; BERKNER, J.; MOLEUS, P. et al. Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, 121, n. 6, p. 1342-1350, 2014.

MENON, D. K.; SCHWAB, K.; WRIGHT, D. W.; MAAS, A. I. *et al.* Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, 91, n. 11, p. 1637-1640, Nov 2010.

MILLER WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. **Mol Cell Endocrinol**. 2013 Oct 15;379(1-2):62-73. doi: 10.1016/j.mce.2013.04.014. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23628605.

MYERS B, MCKLVEEN JM, HERMAN JP. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: implications for the energetics of stress. **Front Neuroendocrinol**. 2014;35(2):180-196. doi:10.1016/j.yfrne.2013.12.003

MUNHOZ TN, NUNES BP, WEHRMEISTER FC, SANTOS IS, MATIJASEVICH A. A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J Affect Disord**. 2016 Mar 1;192:226-33. doi: 10.1016/j.jad.2015.12.038. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26748738.

MCCREA M, et al. Acute effects and recovery time following concussion in collegiate football players: the NCAA Concussion Study. **JAMA** 2003;290:2556-2563

MATTSON MP, GLEICHMANN M, CHENG A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. **Neuron**. 2008 Dec 10;60(5):748-66. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.010. PMID: 19081372; PMCID: PMC2692277.

MCCRORY, P.; MEEUWISSE, W. H.; KUTCHER, J. S.; JORDAN, B. D. et al. What is the evidence for chronic concussion-related changes in retired athletes: behavioural, pathological and clinical outcomes? **Br J Sports Med**, 47, n. 5, p. 327-330, Apr 2013.

NAVARRO A, BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2007 Feb;292(2):C670-86. doi: 10.1152/ajpcell.00213.2006. Epub 2006 Oct 4. PMID: 17020935.



Organização Mundial da Saúde (OMS). Depression. 30 jan 2020. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> . Acesso em 04 set, 2020

ONYSZCHUK G, AL-HAFEZ B, HE YY, BILGEN M, BERMAN NE, BROOKS WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. **J Neurosci Methods**. 2007;160(2):187-196. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.09.007

OMALU, B. I.; BAILES, J.; HAMMERS, J. L.; FITZSIMMONS, R. P. Chronic traumatic encephalopathy, suicides and parasuicides in professional American athletes: the role of the forensic pathologist. *Am J Forensic Med Pathol*, 31, n. 2, p. 130-132, Jun 2010.

OTTE C, GOLD SM, PENNINX BW, PARIANTE CM, ETKIN A, FAVA M, MOHR DC, et al. Major depressive disorder. **Nat Rev Dis Primers**. 2016 Sep 15;2:16065. doi: 10.1038/nrdp.2016.65. PMID: 27629598

PEETERS W, VAN DEN BRANDE R, POLINDER S, BRAZINOVA A, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. **Acta Neurochir (Wien)**. 2015 Oct;157(10):1683-96. doi: 10.1007/s00701-015-2512-7. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26269030; PMCID: PMC4569652.

PEIRCE JM, ALVIÑA K. The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. **J Neurosci Res**. 2019 Oct;97(10):1223-1241. doi: 10.1002/jnr.24476. Epub 2019 May 29. PMID: 31144383

PAPA S, MARTINO PL, CAPITANIO G, GABALLO A, DE RASMO D, et al. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. **Adv Exp Med Biol**. 2012;942:3-37. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1\_1. PMID: 22399416.

PARIANTE CM, LIGHTMAN SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**. 2008 Sep;31(9):464-8. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18675469.

PISOSCHI AM, POP A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25942353.

PEI L, WALLACE DC. Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. *Biol Psychiatry*. 2018 May 1;83(9):722-730. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.11.018. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29290371; PMCID: PMC5891364.

REZIN GT, GONÇALVES CL, DAUFENBACH JF, FRAGA DB, SANTOS PM, et al. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. **Brain Res Bull**. 2009 Aug 14;79(6):418-21. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.03.010. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19393724.

RADI R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4003-4008. doi:10.1073/pnas.0307446101

RIBAS, VICENT; GARCÍA-RUIZ, CARMEN; FERNÁNDEZ-CHECA, JOSÉ C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 151, 2014.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ A, EGEA-GUERRERO JJ, MURILLO-CABEZAS F, CARRILLO-VICO A. Oxidative stress in traumatic brain injury. **Curr Med Chem**. 2014 Apr;21(10):1201-11. doi: 10.2174/0929867321666131217153310. PMID: 24350853.

RODRIGUEZ, U. A.; ZENG, Y.; DEYO, D.; PARSLEY, M. A. et al. Effects of mild blast traumatic brain injury on cerebral vascular, histopathological, and behavioral outcomes in rats. **Journal of neurotrauma**, 35, n. 2, p. 375-392, 2018.

ROBERTSON CL, SARASWATI M, FISKUM G. Mitochondrial dysfunction early after traumatic brain injury in immature rats. **J Neurochem**. 2007 Jun;101(5):1248-57. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04489.x. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17403141.

RAMSEY CP, GLASS CA, MONTGOMERY MB, LINDL KA, RITSON GP, et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Jan;66(1):75-85. doi: 10.1097/nen.0b013e31802d6da9. PMID: 17204939; PMCID: PMC2253896.

RUFF R. Two decades of advances in understanding of mild traumatic brain injury. **J Head Trauma Rehabil**. 2005 Jan-Feb;20(1):5-18. doi: 10.1097/00001199-200501000-00003. PMID: 15668567.

SAATMAN, K. E.; DUHAIME, A. C.; BULLOCK, R.; MAAS, A. I. *et al.* Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **J Neurotrauma**, 25, n. 7, p. 719-738, Jul 2008.

SANTOS, F. d.; CASAGRANDA, L. P.; LANGE, C.; FARIAS, J. C. d. *et al.* Traumatismo cranioencefálico: causas e perfil das vítimas atendidas no pronto-socorro de Pelotas/Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Mineira de Enfermagem**, 17, n. 4, p. 882-893, 2013.

SINGH, I. N.; SULLIVAN, P. G.; DENG, Y.; MBYE, L. H. *et al.* Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26, n. 11, p. 1407-1418, 2006.

SHARMA S, AKUNDI RS. Mitochondria: A Connecting Link in the Major Depressive Disorder Jigsaw. **Curr Neuropharmacol.** 2019;17(6):550-562. doi: 10.2174/1570159X16666180302120322. PMID: 29512466; PMCID: PMC6712299.

SILVER, JONATHAN M., THOMAS W. MCALLISTER, AND DAVID B. ARCINIEGAS, eds. Textbook of traumatic brain injury. **American Psychiatric Pub**, 2018.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. **Free Radical Biology and Medicine**, 88, p. 93-100, 2015.

SILVERBERG ND, PANENKA WJ. Antidepressants for depression after concussion and traumatic brain injury are still best practice. **BMC Psychiatry.** 2019;19(1):100. Published 2019 Mar 27. doi:10.1186/s12888-019-2076-9

SIGNORETTI S, LAZZARINO G, TAVAZZI B, VAGNOZZI R. The pathophysiology of concussion. *PM R.* 2011 Oct;3(10 Suppl 2):S359-68. doi: 10.1016/j.pmrj.2011.07.018. PMID: 22035678.

SHELTON RC. The molecular neurobiology of depression. **Psychiatr Clin North Am.** 2007;30(1):1-11. doi:10.1016/j.psc.2006.12.005

SEMPLE BD, BLOMGREN K, GIMLIN K, FERRIERO DM, *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol.** 2013;106-107:1-16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001

TAYLOR CA, BELL JM, BREIDING MJ, XU L. Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013. *MMWR Surveill Summ*. 2017 Mar 17;66(9):1-16. doi: 10.15585/mmwr.ss6609a1. PMID: 28301451; PMCID: PMC5829835.

THOMAS DG, APPS JN, HOFFMANN RG, MCCREA M, HAMMEKE T. Benefits of strict rest after acute concussion: a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2015 Feb;135(2):213-23. doi: 10.1542/peds.2014-0966. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25560444.

TEASDALE G, JENNETT B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974 Jul 13;2(7872):81-4. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91639-0. PMID: 4136544.

TURRENS JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478

TORRES-PLATAS SG, CRUCEANU C, CHEN GG, TURECKI G, MECHAWAR N. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*. 2014 Nov;42:50-9. doi: 10.1016/j.bbi.2014.05.007. Epub 2014 May 20. PMID: 24858659.

VAGNOZZI R, SIGNORETTI S, TAVAZZI B, CIMATTI M, et al. Hypothesis of the postconcussive vulnerable brain: experimental evidence of its metabolic occurrence. *Neurosurgery*. 2005 Jul;57(1):164-71; discussion 164-71. doi: 10.1227/01.neu.0000163413.90259.85. PMID: 15987552.

VAHIA, I. V., N. M. LANOUILLE, S. GOLSHAN, I. FELLOWS, S. MOHAMED, J. W. et al "Adding antidepressants to antipsychotics for treatment of subsyndromal depressive symptoms in schizophrenia: Impact on positive and negative symptoms." *Indian J Psychiatry* 55(2): 144-148, 2013.

VAGNOZZI R, TAVAZZI B, SIGNORETTI S, AMORINI AM, BELLI A, ET AL. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: mitochondrial-related impairment--part I. *Neurosurgery*. 2007 Aug;61(2):379-88; discussion 388-9. doi: 10.1227/01.NEU.0000280002.41696.D8. PMID: 17762751.

VASWANI M, LINDA FK, RAMESH S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2003 Feb;27(1):85-102. doi: 10.1016/s0278-5846(02)00338-x. PMID: 12551730.

WILLNER P, SCHEEL-KRÜGER J, BELZUNG C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**. 2013 Dec;37(10 Pt 1):2331-71. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.12.007. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23261405.

WANG Y, HEKIMI S. Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol*. 2016 May;26(5):367-378. doi: 10.1016/j.tcb.2015.12.007. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26827090.

XIONG, Y. et al. Prevention of mitochondrial dysfunction in post-traumatic mouse brain by superoxide dismutase. **J Neurochem**, v. 95, n. 3, p. 732-44, Nov 2005. ISSN 0022-3042

YOSHINO A, HOVDA DA, KAWAMATA T, KATAYAMA Y, BECKER DP. Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. *Brain Res*. 1991 Oct 4;561(1):106-19. doi: 10.1016/0006-8993(91)90755-k. PMID: 1797338.

YUAN Q, LI Y, DENG X, et al. Effects of Xingpi Kaiyu Fang on ATP, Na/K-ATPase, and Respiratory Chain Complexes of Hippocampus and Gastrocnemius Muscle in Depressed Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:6054926. Published 2019 Jan 3. doi:10.1155/2019/6054926.

YOHN CN, GERGUES MM, SAMUELS BA. The role of 5-HT receptors in depression. **Mol Brain**. 2017;10(1):28. Published 2017 Jun 24. doi:10.1186/s13041-017-0306-y

ZHANG M, TENG CH, WU FF, et al. Edaravone attenuates traumatic brain injury through anti-inflammatory and anti-oxidative modulation. **Exp Ther Med**. 2019;18(1):467-474. doi:10.3892/etm.2019.7632

ZHANG, HONGQIAO; DAVIES, KELVIN JA; FORMAN, HENRY JAY. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 314-336, 2015.

ZHU CB, LINDLER KM, OWENS AW, DAWS LC, BLAKELY RD, HEWLETT WA. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(13):2510-2520. doi:10.1038/npp.2010.116