



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

**Efeitos do exercício físico sobre o processo inflamatório e  
sobre o déficit motor induzidos pelo traumatismo  
cranioencefálico em ratos**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Bibiana Castagna Mota**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Efeitos do exercício físico sobre o processo inflamatório e  
sobre o déficit motor induzidos pelo traumatismo  
cranioencefálico em ratos**

**Por**

**Bibiana Castagna Mota**

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

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes**

**Co-orientadora: Michele Rechia Fighera**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

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

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

**Efeitos do exercício físico sobre o processo inflamatório e  
sobre o déficit motor induzidos pelo traumatismo  
cranioencefálico em ratos**

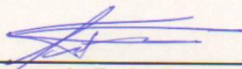
elaborada por

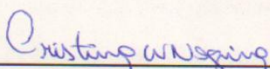
**Bibiana Castagna Mota**


como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

  
Cristina Wayne Nogueira Dra. (UFSM)  
(1º membro da banca)

  
Robson Luiz Puntel Dr. (UNIPAMPA)  
(2º membro da banca)

Santa Maria, 21 de fevereiro de 2013



***Dedico esta dissertação à minha família***

***Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância***

***(John F. Kennedy)***

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Bolli Mota e Ana Maria Castagna de Vargas, pela vida, pela formação de meu caráter, pela educação, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim, apoiando-me de forma incondicional. Aos meus “segundos pais”, meu padastro Beto e minha madastra Juliana, também pelo apoio durante todo este processo. Aos meus queridos irmãos, Júlio e Elisa, á minha cunhada Zuzu, ao meu cunhado Cristian e ao meu querido sobrinho Chico, pelo carinho, atenção e por sempre acreditarem em mim. A minhas avós Roma e Tetê, pessoas simplesmente maravilhosas e inspiradoras, pelo exemplo e apoio em todos os momentos. Aos meus tios, tias, primos e primas, e a toda família que sempre esteve ao meu lado dando força e carinho para eu seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis. A presença de vocês significou segurança e a certeza de que nunca estive sozinha nesta caminhada. Amo muito todos vocês!

Aos meus orientadores e grandes amigos, Nando e Michele, pela amizade, compreensão, confiança, ensinamentos e estímulo durante o tempo a mim dedicado. Minha eterna admiração e reconhecimento.

Aos professores e amigos Ana e Mauro e professores Carlos e Maribel pela oportunidade de conviver e aprender com vocês, mesmo com pouco tempo de convívio sempre que necessário estiveram dispostos a me ajudar.

A minha segunda família, que são os meus colegas e irmãos do Bioex. Samurai, Léo, Iuri, Fred, Rô, Luiz, Maurício, Fernando, Lelê, Mauro, Busanello, Dedé, Brescianni (álcool gel), Dani, Marla; e de forma mais do que especial as “luluzinha da seita”, Mauren, Fernanda e Aninha. Obrigada por tudo, pelo carinho, pelas brigas e desentendimentos, pela troca de conhecimento, por sempre estarem do meu lado e por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho. Agradeço todos os dias pela oportunidade de ter convivido com cada um e por poder compartilhar de momentos maravilhosos e inesquecíveis ao lado de vocês. Vou sentir muita falta, de todos, pessoas muito especiais para mim e que sempre estarão guardados no meu coração.

Ao pessoal do prédio 21, em especial a Cissa e o Vini, aos colegas do prédio 18, e demais companheiros da pós, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento. Meu profundo agradecimento!

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

E por fim, porém de maneira alguma menos importante agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas e inesquecíveis no meu caminho.

Muito obrigada!



## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **Efeitos do exercício físico sobre o processo inflamatório e sobre o déficit motor induzidos pelo traumatismo cranioencefálico em ratos**

Autor: Bibiana Castagna Mota

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Co-orientadora: Michele Rechia Figuera

Local e data de defesa: Santa Maria, 21 de fevereiro de 2013.

O traumatismo cranioencefálico (TCE) constitui um problema de saúde pública, sendo considerada uma das principais causas de morte entre crianças e jovens adultos em países desenvolvidos. O TCE pode ser definido como uma agressão mecânica externa ao encéfalo, que pode produzir um estado alterado de consciência levando ao comprometimento das habilidades cognitivas e/ou motoras. Neste contexto, o processo inflamatório tem papel importante do desenvolvimento e na exacerbação do dano secundário após o TCE, mediando, através da liberação de citocinas, o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), a formação de edema e promovendo o aumento da migração de leucócitos após o TCE. Sabe-se que o exercício físico oferece proteção sobre varias doenças e insultos do Sistema Nervoso Central (SNC). No entanto, poucos são os estudos que mostram os efeitos profiláticos da prática regular de exercício físico diante dos danos decorrentes do TCE. Portanto, o objetivo desta dissertação foi verificar se o exercício físico protege da resposta inflamatória aguda e do comprometimento motor induzido pelo TCE em ratos. Para isso, os animais realizaram exercício físico durante quatro semanas e posteriormente foram submetidos ao TCE pelo modelo de lesão por percussão de fluido (LPF). Vinte e quatro horas após o TCE os resultados obtidos mostraram que houve um comprometimento da função motora, seguido do aumento na permeabilidade da BHE e da inflamação cerebral, caracterizada pelo elevação nos níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL -1 $\beta$ ) , do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e pela diminuição nos níveis de interleucina-10 (IL-10). Além disso, houve um o aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e uma inibição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase após o TCE sugerindo que a abertura da BHE, seguida pela infiltração de neutrófilos e inflamação cerebral podem contribuir para a falência dos alvos seletivos. Os resultados também demonstraram que o exercício físico prévio protegeu do comprometimento motor e do aumento na permeabilidade da BHE, bem como aumentou dos níveis de IL-10 e protegeu do aumento dos níveis cerebrais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , indzidos pela lesão por percussão de fluido (LPF). Este protocolo de exercício também protegeu do aumento da atividade da MPO e da inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase após o TCE. Esta proteção correlacionada com a diminuição da atividade da MPO, sugere que uma modificação no perfil inflamatório cerebral, provocada pelo exercício físico, pode estar reduzindo a lesão inicial e limitando o dano secundária após o TCE.

Palavras chave: Traumatismo cranioencefálico; barreira hematoencefálica; inflamação; dano motor; exercício físico; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

**ABSTRACT**

Master Dissertation

Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**Effects of physical exercise on the inflammatory process and motor deficit induced by traumatic brain injury in rats**

Author: Bibiana Castagna Mota

Advisor: Luiz Fernando Freire Royes

Co-aadvisor: Michele Rechia Figuera

Date and place of defense: Santa Maria, February 21<sup>st</sup>, 2013

Traumatic brain injury (TBI) is a public health problem, and is considered a leading cause of death among children and young adults in industrialized countries. TBI can be defined as a mechanical external aggression to the brain, which may produce an altered state of consciousness leading the cognitive and / or motor impairment. In this context, the inflammatory process plays an important role in the development and exacerbation of secondary damage after TBI, mediating, through the release of cytokines, increased permeability of the blood brain barrier (BBB), edema formation and promoting the accumulation of leukocytes after TBI. Exercise provides protection on a variety of diseases and insults of the Central Nervous System (CNS). However, there are few studies showing the prophylactic effects of regular exercise on the damage caused by TBI. Therefore, the aim of this study was to investigate whether physical exercise protects against acute inflammatory response and motor impairment induced by TBI in rats. For this, the animals performed exercise for four weeks and then underwent the model of TBI by fluid percussion injury (FPI). Twenty-four hours after TBI the results showed that there was an impairment of motor function, followed by increased permeability of the BBB and brain inflammation characterized by increased levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and by decreasing levels of interleukin-10 (IL-10). Furthermore, increased myeloperoxidase (MPO) and inhibition of enzyme activity Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase after TBI suggests that the opening of the BBB, followed by infiltration of neutrophils and brain inflammation may contribute to failure of selected targets leading to damage side. The results also demonstrated that physical exercise protected against motor impairment, BBB permeability and also protect against an increase in brain levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and decrease levels of IL-10 induced by fluid percussion injury (FPI). This exercise protocol also protected the increase of MPO activity and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase after TBI. This protection correlated with decreased MPO activity, suggesting that a change in cerebral inflammatory profile, caused by physical exercise, may be reducing the initial injury and limiting secondary damage after TBI.

Key words: Traumatic brain injury; blood brain barrier inflammation; motor impairment; physical exercise; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Tabela 1 – Escala de Coma de Glasgow	18
Figura1 – Interação do SNC e do sistema imune periférico após TCE	29

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAT	Catalase
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças
CREB	Proteína responsiva a adenosina monofosfato cíclico
DAD	Dano Axonal Difuso
ECG <sub>w</sub>	Escala de coma de Glasgow
ER	Espécie Reativa
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FCE	Fluido cérebro-espinhal
H&E	Hematoxilina e Eosina
I-CAM	Moléculas de adesão intracelular
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
ICC	Impacto cortical controlado
GPx	Glutaciona peroxidase
LPF	Lesão por percussão de fluido
LTP	Potenciação a longo prazo
MPO	Mieloperoxidase

NGF	Fator de crescimento neural
PGC-1 $\alpha$	Coativador 1 $\alpha$ do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PTM	Poros de transição mitocondrial
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TAD	Trauma axonal difuso
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
V-CAM	Moléculas de adesão vascular

**SUMÁRIO**

INTRODUÇÃO .....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO .....	15
1.1.1. Definição e Dados Epidemiológicos .....	15
1.1.2. Classificações do TCE .....	17
1.1.2.1. De acordo com a Gravidade da Lesão .....	17
1.1.2.2. De acordo com a Progressão da Lesão.....	19
1.1.2.3. De acordo com o Tipo de Impacto .....	20
1.1.2.4. De acordo com a Distribuição da Lesão .....	21
1.1.3. Trauma Axonal Difuso (TAD) .....	21
1.1.4. Fisiopatologia do TCE .....	22
1.1.4.1. Dano Primário .....	23
1.1.4.2. Dano Secundário .....	23
1.1.4.3. Excitotoxicidade .....	24
1.1.4.4. Inflamação .....	25
1.1.4.5. Resposta inflamatória e TCE .....	26
1.1.4.6. Citocinas e TCE .....	28
1.2. DÉFICIT MOTOR PÓS-TRAUMÁTICO .....	29
1.3. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase E TCE .....	31
1.4. EXERCÍCIO FÍSICO .....	33
1.4.1. Exercício Físico e SNC .....	33
1.4.2. Exercício Físico e TCE.....	34
1.5. OBJETIVO.....	37
1.5.1. Objetivo Geral .....	37
1.5.2. Objetivos Específicos .....	37
ARTIGO CIENTÍFICO .....	38
2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
2.1. Exercise Pre-conditioning Reduces Brain Inflammation and Protects against Toxicity Induced by Traumatic Brain Injury: Behavioral and Neurochemical Approach. ....	39
2.1.1. Título em português .....	39
2.1.2. Autores.....	39
Discussão.....	50

3. DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES .....	56
4. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## **APRESENTAÇÃO**

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

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

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

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



---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO**

#### **1.1.1. Definição e Dados Epidemiológicos**

O traumatismo cranioencefálico (TCE) constitui um problema de saúde pública que afeta mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo (ZITNAY, 2005), sendo considerada uma das principais causas de morte entre crianças e jovens adultos em países industrializados (BAKER et al., 2008). Por definição, o TCE é uma agressão ao cérebro causada por uma força física externa, que pode produzir um estado alterado de consciência, que resulta em comprometimento das habilidades cognitivas ou físicas, podendo causar distúrbios neurológicos temporários ou permanentes (SMITH, S. L. et al., 1994).

O TCE é uma epidemia silenciosa que afeta profundamente as pessoas que o sofrem, seus familiares, e toda a sociedade. Além disso, o TCE contribui para a morte precoce e é alto o índice de incapacidade para aqueles que dele sobrevivem (MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK, 2008). Os pacientes que sobrevivem a este evento podem apresentar deficiências e incapacidades que irão interferir na capacidade destes indivíduos em desempenhar suas funções diárias, laborais e prejudicando, desta maneira, sua participação ativa na sociedade (SILVER et al., 2005; ATKINS et al., 2009).

Nos Estados Unidos (EUA), o TCE é uma das principais causas de morte por lesão, e indivíduos de todas as idades, raças/etnias, e de todos os níveis socioeconômicos podem ser afetados (CORONADO et al., 2011). Segundo dados do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention - CDC), durante 2002 e 2006, cerca de 1,7 milhões de pessoas nos EUA sofreram TCE. Destes indivíduos, aproximadamente 52 mil morreram, 275 mil foram hospitalizadas, e cerca de

1,4 milhões foram tratados e liberados por um serviço de emergência (FAUL et al., 2007).

Diante disso, estudos epidemiológicos são de extrema importância, pois possibilitam não só o entendimento da magnitude desse evento que é o TCE, bem como visam identificar os principais grupos e situações de risco e as suas consequências para os indivíduos que o sofrem. Nesse contexto, um estudo mostrou que nos EUA as principais causas do TCE são: as quedas (35%), seguidas dos acidentes automobilísticos (17%), dos acidentes de trabalho ou em decorrência da prática de esportes (16,5%), dos assaltos (10%) e de outras causas desconhecidas (21%) (Faul et al., 2010). Os dados epidemiológicos ainda mostram que, nesta mesma população, os indivíduos na faixa etária de 15 a 24 anos e os indivíduos mais velhos, acima de 64 anos, são considerados a população com maior risco de sofrer um TCE, sendo este tipo de lesão cerebral muito mais frequente entre os homens do que entre as mulheres, com uma incidência de 1,6 a 2,8 vezes maiores para os homens (SILVER et al., 2005).

Alguns estudos também fazem estimativas sobre o custo do TCE. Neste sentido, Max e colaboradores (1990) realizaram os primeiros levantamentos sobre valores gastos com TCE nos EUA e, interessantemente, mostraram que os valores despendidos com o TCE leve e grave por paciente em 1985 foram muito próximos (MAX; RICE; MACKENZIE, 1990). Em 2006, outro estudo revelou que o custo total dos norte americanos, no ano de 2000, com pessoas vítimas de lesões encefálicas foi cerca de \$406 bilhões; sendo deste total, \$80 bilhões gastos com tratamento médico e \$326 bilhões referentes à perda da produtividade desses indivíduos (CORSO et al., 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos acerca do TCE são um pouco escassos, além de serem segmentados por regiões muito específicas e por apresentarem muitas diferenças metodológicas. No entanto, de acordo com levantamentos, estima-se que, no Brasi, 74% dos TCEs ocorram devido a acidentes de trânsito (OLIVEIRA et al., 2012). Ainda, no Brasil, as maiores vítimas de TCE são adultos jovens, com idade média de 34 anos, acarretando assim, importante morbidade para os sobreviventes (DE OLIVEIRA THAIS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Porém, mais dados sobre este tipo de lesão encefálica são necessários para que se possa avaliar e planejar estratégias de

prevenção e intervenção que sejam mais efetivas (CORONADO et al., 2012). Desse modo, é importante compreender a maneira pela qual as informações são obtidas nestes estudos, para que os resultados possam ser comparados e para que estes dados se tornem mais fidedignos à realidade do TCE (SILVER et al., 2005).

### **1.1.2. Classificações do TCE**

Para melhor compreensão, o TCE pode ser classificado de acordo com a gravidade da lesão, como traumatismo leve, moderado ou grave; de acordo com a progressão da lesão, como dano primário e dano secundário; de acordo com o tipo de impacto, como lesão por contato ou lesão por força de aceleração/desaceleração; ou quanto à distribuição da lesão, como focal ou difuso (SILVER et al., 2005).

#### **1.1.2.1. De acordo com a Gravidade da Lesão**

No princípio, consideravam-se muito as características clínicas para determinar e estratificar o TCE quanto a sua gravidade como leve, moderada ou grave. Eram levadas em consideração a presença e o tipo de ferimento, ou seja, a ocorrência ou não de fratura de crânio, de contusão cerebral e/ou de hematomas cerebrais, além de ser considerado também nesta avaliação, o tempo de inconsciência e de amnésia pós-traumática (ANNEGERS et al., 1980). No entanto, ao longo dos anos, alguns autores propuseram que tanto a perda de consciência como a amnésia não devem ser consideradas como bons parâmetros para classificar a gravidade do trauma, visto que, nem sempre estão associados às lesões encefálicas (FREY, 2003).

Por isso, tem sido proposto o uso de outros métodos, como a utilização de exames de imagem para diagnóstico na identificação da gravidade da lesão encefálica do TCE, juntamente com técnicas de avaliações mais rápidas e que

não necessitem de muitos recursos, mas que sejam fidedignas e consigam mostrar a severidade da lesão (MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK, 2008). Clinicamente, é de extrema importância que se consiga estimar, de forma rápida, a extensão e a severidade da lesão do TCE, para que sejam realizados os procedimentos e condutas adequados aos pacientes no momento inicial da chegada ao serviço de atendimento. Neste contexto, atualmente, a Escala de Coma de Glasgow (ECG<sub>w</sub>; Tabela 1) tem sido largamente aceita e utilizada na clínica, como triagem para avaliação da gravidade inicial da lesão do TCE no momento da admissão do paciente ao atendimento médico (SAATMAN et al., 2008).

Escala de Coma de Glasgow		
Melhor resposta visual (O)	Espontânea	4
	ao falar	3
	ao sentir dor	2
	olhos sempre fechados	1
Melhor resposta motora (M)	Obedecer	6
	Localizar	5
	reflexo de retirarada	4
	flexão anormal	3
	resposta extensora	2
	sem resposta motora	1
Melhor resposta verbal (V)	Orientada	5
	conversa confusa	4
	palavras inapropriadas	3
	sons incompreensíveis	2
	sem resposta verbal	1
Escore de coma= (O+M+V)		

Tabela 1- Escala de Coma de Glasgow. Escala amplamente utilizada para avaliar a gravidade inicial do TCE (Adaptada de SILVER et al.,2005)

Esta escala foi proposta por (TEASDALE; JENNETT, 1974) Teasdale e Jennett (1974) como forma de avaliar a duração e a profundidade das

alterações de consciência e do coma, levando em consideração três manifestações comportamentais, que são: resposta motora, resposta verbal e resposta de abertura ocular (TEASDALE; JENNETT, 1974). O responsável pelo atendimento inicial do paciente realiza a avaliação da gravidade do TCE atribuindo escores a cada um dos quesitos considerados na ECG<sub>w</sub> e, assim, o TCE é classificado como leve (quando este escore varia entre 13 e 15), moderado (quando varia de 9 a 12) e grave (quando o escore fica abaixo de 9) (SAATMAN et al., 2008).

Embora a ECG<sub>w</sub> seja amplamente utilizada e apresente informações consistentes para determinação inicial da gravidade do TCE, esta apresenta algumas limitações na sua utilização com determinados pacientes. Em alguns casos, ela acaba sendo difícil de ser aplicada, como em avaliações de crianças, pacientes com edema facial em decorrência do trauma, pacientes sob a influência de álcool ou de outras substâncias, e de pacientes incapazes de responder ao componente verbal por causa de diferenças de linguagem (SILVER et al., 2005; MAAS; ROOZENBEEK; MANLEY, 2010). Porém, mesmo apresentando certas limitações e restrições, a ECG<sub>w</sub> ainda é uma das ferramentas mais utilizadas para mensurar inicialmente a gravidade da lesão cerebral (SILVER et al., 2005).

### 1.1.2.2. De acordo com a Progressão da Lesão

Inicialmente, a determinação da gravidade das lesões do TCE baseava-se muito em dados clínicos. Portanto, se o paciente estivesse consciente e conseguisse se comunicar facilmente após o trauma acreditava-se que a lesão havia sido leve (SILVER et al., 2005). No entanto, em 1975, Reilly e colaboradores relataram que alguns pacientes, vítimas de TCE, tinham ótima capacidade de se comunicar após a lesão, mas alguns destes apresentavam complicações e, alguns dias após o trauma, vinham a óbito (REILLY et al., 1975).

Estas observações de casos onde os pacientes falavam inicialmente após o TCE e dias após apresentavam um agravamento do quadro da lesão e

muitas vezes vinham a óbito, mostrou evidências de que, embora a estrutura inicial danificada fosse pequena, essa lesão havia iniciado uma sequência progressiva de eventos que levaram estes pacientes a morte ou a incapacidade permanente. A partir de então, as lesões decorrentes do TCE passaram a ser classificadas como dano primário e dano secundário. O dano primário é entendido como o resultado das forças mecânicas que atuam para provocar o ferimento encefálico; já o dano secundário, abrange todas as alterações biomoleculares e fisiológicas que acontecem em consequência ao dano primário, podendo se desenvolver de forma prolongada e progressiva (RAY; DIXON; BANIK, 2002; SILVER et al., 2005).

### 1.1.2.3. De acordo com o Tipo de Impacto

O entendimento dos mecanismos que podem gerar a lesão encefálica do TCE é importante para compreender de que maneira determinadas forças podem desencadear diferentes tipos de lesões. As circunstâncias nas quais um evento de TCE pode ocorrer são diversas e complexas e, portanto, a compreensão dos mecanismos que podem desencadear este tipo de lesão torna-se relevante. Neste sentido, foram determinados dois mecanismos principais de lesão cerebral que são: dano por contato e dano por aceleração/desaceleração (NORTJE; MENON, 2004; SILVER et al., 2005).

O dano por contato compreende as lesões que ocorrem em condições nas quais a cabeça é atingida por um objeto ou ainda, quando há contato entre o encéfalo e o crânio, gerando normalmente lesões mais localizadas. Por outro lado, o dano por aceleração/desaceleração ocorre quando há ação de forças externas resultando no movimento irrestrito da cabeça, fazendo com que o cérebro movimente-se dentro do crânio chocando-se contra o mesmo, e levando a geração de uma força de cisalhamento e compressão, que resulta geralmente em hematomas subdurais e em danos aos axônios (SILVER et al., 2005; SAATMAN et al., 2008).

#### 1.1.2.4. De acordo com a Distribuição da Lesão

A lesão encefálica do TCE, com base no diagnóstico clínico e radiológico também pode ser classificada por sua distribuição de duas maneiras, como dano focal ou como dano difuso (GRAHAM et al., 1995). O dano focal é caracterizado por lesões que se restringem a uma única porção do encéfalo e resultam mais frequentemente de traumas causados por contato. Ainda, de acordo com Gennarelli & Graham (2005), as injúrias focais incluem hematomas epidurais e subdurais, contusões, lacerações e fraturas do crânio (GENNARELLI; GRAHAM, 1998).

Por outro lado, o dano difuso compreende as lesões que se distribuem de forma mais generalizada pelo encéfalo, sendo considerados danos multifocais, e tendo freqüentemente como principal consequência o dano axonal difuso (DAD). Este tipo de lesão é geralmente causado por mecanismos traumáticos por aceleração/desaceleração (SILVER et al., 2005).

#### **1.1.3. Trauma Axonal Difuso (TAD)**

#### **1.1.4. Trauma Axonal Difuso (TAD)**

O trauma axonal difuso (TAD) compreende o conjunto de patologias axonais causadas pelo trauma que levam ao rompimento dos axônios. O TAD pode ser causado por um dano, focal ou difuso, ao encéfalo e não é limitado ao momento do impacto, podendo prolongar-se por um determinado período a partir lesão inicial (MAXWELL et al., 2003). Além disso, diferente do que se acreditava anteriormente, este tipo de dano não é uma característica exclusiva do trauma grave, sendo também observado desde o trauma leve ao trauma grave (BLUMBERGS et al., 1995). Dentre as principais alterações axonais provocadas pelo TAD podemos citar o edema axolemal, as alterações e o bloqueio do transporte axonal, a alterações no citoesqueleto consistindo na



compactação do neurofilamentos e a perda da rede de microtúbulos (OKONKWO; POVLISHOCK, 1999).

Ao longo dos anos, algumas teorias sobre os mecanismos pelos quais o trauma inicia o processo de degeneração axonal vêm sendo propostas. Uma das teorias sugere que o estiramento físico no momento da lesão resulta em dano ao axolema, provocando alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, fazendo com que os axônios percam a capacidade de manter a homeostase iônica que resulta em mudanças nas concentrações de íons como cálcio, potássio, sódio e cloreto dentro do axoplasma (PETTUS et al., 1994; SILVER et al., 2005). Em certas fibras, estas alterações na homeostase iônica podem ativar determinadas proteases que por sua vez, desnaturam o citoesqueleto dos axônios (GENNARELLI, 1996). No entanto, esta hipótese não foi totalmente aceita (SMITH, D. H. et al., 1999) surgindo em seguida, uma segunda teoria para o TAD, a qual sugere que o TCE pode mecanicamente ou funcionalmente, danificar os neurofilamentos, prejudicando e interrompendo o transporte axoplasmático (STONE; SINGLETON; POVLISHOCK, 2000).

Alguns achados experimentais demonstraram que o TAD induz ao aparecimento de uma série de alterações histológicas, as quais dependem do tempo de sobrevivência do paciente após o trauma, o que permite melhor identificar a progressão da lesão. Nos indivíduos que sobrevivem por pouco tempo, as lesões aparecem de forma hemorrágica, mas com o tempo resultam no encolhimento dos axônios com a posterior formação de cicatrizes císticas. Por outro lado, em pacientes que sobrevivem por um período maior, o edema axonal é facilmente verificado em colorações por prata, hematoxilina e eosina (H&E) e através de métodos imunohistoquímicos (SHERIFF et al., 1994). No entanto, estes estudos histológicos só podem ser realizados após a morte do paciente. Por isso, atualmente, exames de imagem estão sendo muito utilizados com o objetivo de fornecer melhores diagnósticos sobre a lesão gerada pelo TAD (PINEDA et al., 2007).

### **1.1.5. Fisiopatologia do TCE**

#### 1.1.5.1. Dano Primário

O TCE é decorrente da ação de forças mecânicas externas que agem gerando um impacto ao crânio e, conseqüentemente este impacto pode provocar lesões à estrutura cerebral. Neste sentido, o dano primário compreende estas lesões que ocorrem imediatamente ao impacto (RAY; DIXON; BANIK, 2002; STIVER; MANLEY, 2008). Este impacto causa lesões a partir de dois mecanismos, que são: lesão por contato e lesão por forças inerciais.

Estes dois tipos de lesão podem levar a padrões distintos de ferimentos caracterizados por dano focal e por dano difuso. Assim, lesões por contato causam primariamente ferimentos como fratura de crânio, hematoma epidural e subdural, além de ferimentos ao escalpo. Por outro lado, forças inerciais levam a hematomas intracerebrais e subdurais, além de dano axonal difuso (GRAHAM et al., 1995).

#### 1.1.5.2. Dano Secundário

Em consequência ao dano primário, ocorre uma série de alterações progressivas em nível molecular, que compreendem o dano secundário (SILVER et al., 2005). Esses eventos moleculares que se iniciam no momento do impacto podem desenvolver-se durante horas, meses ou anos. O dano secundário, normalmente inclui o edema cerebral, o aumento da pressão intracraniana, dano cerebral hipóxico e ou isquêmico, excitotoxicidade, estresse oxidativo, resposta inflamatória, apoptose e disfunção metabólica (VINK et al., 2003; WERNER; ENGELHARD, 2007). No entanto, diferente do dano primário, os mecanismos que levam ao dano secundário são potencialmente passíveis de intervenção terapêutica devido ao seu acontecimento progressivo. Por isso, na maioria das vezes, são alvos para o desenvolvimento de estratégias de tratamento das sequelas causadas pelo TCE (RAY; DIXON; BANIK, 2002).

### 1.1.5.3. Excitotoxicidade

O TCE desencadeia primariamente uma despolarização massiva dos neurônios e células gliais, devido a forças inerciais derivadas do impacto ao crânio. Esta despolarização excessiva resulta em uma exacerbada liberação de neurotransmissores excitatórios (GENTRY, 1994). O principal neurotransmissor excitatório que contribui para morte e disfunção celular cerebral após o TCE é o glutamato, uma vez que suas concentrações extracelulares tornam-se significativamente aumentada após o trauma (PALMER et al., 1993; GLOBUS et al., 1995; BULLOCK et al., 1998; GREVE; ZINK, 2009).

A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos induz a um aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular (SATTLER; TYMIANSKI, 2000; LIPTON; BOSSY-WETZEL, 2002). Muitos processos celulares são dependentes das ações do  $\text{Ca}^{2+}$ , porém, como mencionado anteriormente, em excesso este íon pode ser altamente prejudicial. Por isso, é importante que suas concentrações permaneçam em níveis celulares adequados. Neste sentido, a mitocôndria desempenha um papel fundamental na homeostase citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , pois devido a sua eletronegatividade ela tem capacidade de captar este íon através de transportadores presentes na membrana mitocondrial (HAYES; DIXON, 1994).

No entanto, o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da mitocôndria pode desregular sua função, resultando na abertura dos poros de transição mitocondrial (PTM), no inchaço mitocondrial, perda do potencial de membrana, diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; DUGAN et al., 1995; VERWEIJ et al., 2000; SULLIVAN et al., 2005). Assim, estes eventos, podem estar relacionados com o início do processo de morte celular diretamente via apoptose e, indiretamente via diminuição e falha na produção de ATP (KIM; PARK, 2003). A abertura PTM também leva a um edema osmótico devido a um grande influxo de  $\text{K}^+$  e pode levar ao rompimento e liberação de proteínas do interior da mitocôndria, como o citocromo c, molécula esta, importante na sinalização e ativação do processo de apoptose celular (SULLIVAN et al., 2005).

#### 1.1.5.4. Inflamação

O termo inflamação refere-se ao conjunto de processos celulares caracterizados por mudanças na permeabilidade da vasculatura local, ativação de células do sistema imune residente, infiltração de células polimorfonucleares (neutrófilos no caso de inflamação aguda) ou mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas no caso de inflamação crônica), decorrentes da resposta do sistema imunológico a danos celulares e teciduais, permitindo assim a chegada das células de defesa ao local da lesão (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004; GRAEBER; LI; RODRIGUEZ, 2011).

Muitos destes processos envolvem a liberação de mediadores inflamatórios conhecidos como citocinas, que consistem em um grande grupo de proteínas solúveis, produzidas por células dendríticas, macrófagos e outros tipos de células do sistema imune, que têm como função mediar e regular a resposta inflamatória aguda. Dentre estas citocinas algumas apresentam respostas pro inflamatórias, onde podemos citar o Fator de Necrose Tumoral ( $TNF-\alpha$ ), a Interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) e a Interleucina-6 (IL-6) e outras exercem um efeito antiinflamatório, como é o caso da Interleucina-10 (IL-10) (GOPCEVIC et al., 2007; ABBAS et al., 2011).

Além das citocinas, outro grupo de moléculas, denominadas quimiocinas, está diretamente relacionado com o início do processo inflamatório, estimulando e regulando o recrutamento das células de defesa (neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos) do sangue para o tecido lesado. Este mecanismo de infiltração das células de defesa para o local da lesão depende da adesão destas células ao endotélio através da ação de duas classes de moléculas, denominadas selectinas e integrinas e de seus ligantes e, em seguida, do movimento dos mesmos do endotélio, para dentro do tecido alvo. (ABBAS et al., 2011; DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Uma vez no tecido, estes neutrófilos e macrófagos ativados convertem o oxigênio molecular em EROs, que destroem os micro-organismos e outras células; (ABBAS et al., 2011).

A resposta inflamatória é observada em diversas patologias e insultos ao SNC, sendo esta, uma combinação de respostas agudas e crônicas das células deste tecido a um determinado dano, podendo contribuir para a lesão tecidual, disfunção e perda neuronal ou para a regeneração e reparo deste tecido (RIVEST, 2003; DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). De maneira geral, em consequência a uma lesão do SNC pode ocorrer o extravasamento de produtos sanguíneos e de componentes intracelulares, a formação de ERs e a ativação de células especializadas, propiciando assim o início da resposta inflamatória (JULIET; MAO; DEL BIGIO, 2008; ROCK; KONO, 2008; BYE; TURNLEY; MORGANTI-KOSSMANN, 2012).

Estes eventos iniciais sinalizam a liberação de diversos mediadores inflamatórios, os quais facilitam o influxo de células imunes periféricas ao local da lesão, podendo exacerbar esta inflamação. Além disso, todo este processo inicial também leva ao aumento da expressão de ligantes de integrinas, dos quais podemos citar as moléculas de adesão vascular (V-CAM) e intracelular (I-CAM) facilitando assim o extravasamento de células inflamatórias para o SNC (HAUSMANN; ROGLER, 2008).

### 1.1.5.5. Resposta inflamatória e TCE

A resposta inflamatória é uma característica proeminente associado a diferentes condições de danos cerebrais, incluindo o TCE (LIAN et al., 2012). Após o dano primário, ocorre uma resposta multifatorial no tecido e a ativação de respostas inflamatórias, a partir de horas até alguns dias após o trauma, influenciando assim a sobrevivência neuronal e a recuperação funcional do tecido lesado (SHLOSBERG et al., 2010).

O dano secundário decorrente do TCE também pode ser exacerbado pelo estabelecimento de uma resposta inflamatória (GENNARELLI; GRAHAM, 1998). A ativação da microglia e astrogliia causadas pela presença de restos celulares, gerados pela laceração do tecido cerebral, inicia o processo inflamatório (MOREAU et al., 2005). Em seguida, a liberação de proteases e de mediadores pró-inflamatórios pelas células de defesa do parênquima cerebral

desencadeia a abertura da BHE e conseqüentemente a entrada de moléculas protéicas para o tecido cerebral (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

A BHE tem a função de proteger o SNC e apresenta um papel importante na criação de um ambiente altamente restrito, controlando o que passa da corrente sanguínea para o cérebro (CHODOBSKI; ZINK; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011). A BHE é formada por células endoteliais ligadas por *tight junctions* (ABBOTT, 2002), que em condições patológicas, como no TCE, podem ser rompidas aumentando sua permeabilidade e assim permitindo que as células do sistema imunológico permeiem ao parênquima cerebral, em resposta à sinalização de citocinas e quimiocinas liberadas pelas células imunes residentes (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012; WILSON et al., 2012).

Após o TCE, além da resposta inflamatória, outro fator que contribui para a disfunção da BHE e a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios, particularmente de glutamato (ROBERTSON et al., 2001; BRAMLETT; DIETRICH, 2004). Este, ao interagir com os receptores glutamatérgicos, provoca um aumento do influxo de íons  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  para o meio intracelular, desencadeando um processo excitotóxico, podendo assim, levar ao aumento na permeabilidade da BHE (WERNER; ENGELHARD, 2007). Neste sentido, a excitotoxicidade, o aumento na liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, a ativação do sistema imune residente, o recrutamento de neutrófilos, a ativação microglial e alterações mitocondriais que aumentam a produção de EROs após o TCE são importantes mecanismos relacionados com alterações e com a abertura das *tight junctions* (PUN; LU; MOOCHHALA, 2009).

O aumento na permeabilidade da BHE a permite a passagem de moléculas inflamatórias para dentro e para fora do local lesionado iniciando uma cascata de respostas no cérebro e em órgãos periféricos (DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Diante disto, é bem descrito que o TCE leva a disfunção e rompimento da BHE em modelos animais, contribuindo assim para um aumento da resposta inflamatória, edema e morte neuronal (LENZLINGER et al., 2004; SHLOSBERG et al., 2010).

#### 1.1.5.6. Citocinas e TCE

A ativação da micróglia é parte importante da resposta à lesão cerebral, desencadeando a liberação de alguns mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, as quimiocinas, os fatores de crescimento, o óxido nítrico, as prostaglandinas e as EROs, que serão importantes para modular a resposta inflamatória, bem como para o processo de recuperação após a lesão (DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Alguns estudos têm evidenciado que muitas citocinas são expressas após TCE, incluindo IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a interleucina-8 (IL-8) (FINFER; COHEN, 2001; MUSSACK et al., 2002; GOPCEVIC et al., 2007). Os efeitos negativos da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  após TCE são claros, porém, o papel da IL-6 é mais ambíguo, podendo apresentar tanto efeitos pró como antiinflamatórios (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

Estudos em humanos sugerem que os níveis plasmáticos de IL-8 podem ser parâmetros preditivos de mortalidade em TCE grave (MUSSACK et al., 2002; GOPCEVIC et al., 2007). Ainda, a ativação dos astrócitos e da micróglia, logo após o trauma, promove a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , levando a uma liberação adicional de citocinas e à produção de mediadores do sistema imune periférico (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006). O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  parecem estar mais associados com a ativação da microglia podendo sinalizar o início do processo inflamatório. Já a IL-6 no cérebro lesionado tem sido associada à astrogliose, lesão neuronal, e infiltração de células periféricas (TAUPIN et al., 1993; GHIRNIKAR; LEE; ENG, 1998). Diante disto, estudos clínicos têm demonstrado níveis elevados de TNF- $\alpha$  em pacientes com TCE (FINFER; COHEN, 2001; CRESPO et al., 2008), bem como há descrições de níveis elevados de IL-6, no plasma e no líquido, após o TCE (FINFER; COHEN, 2001), demonstrando o envolvimento de tais mediadores na inflamação pós-traumática.

Neste sentido, os eventos inflamatórios mais importantes que contribuem para a patologia do TCE são astrogliose, ativação da microglia, infiltração de células imunes no sistema nervoso central (principalmente os

neutrófilos) e neurodegeneração (Figura 1) (CERNAK; O'CONNOR; VINK, 2002; DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Dessa forma, a natureza complexa das respostas inflamatórias agudas e crônicas após o TCE pode agravar o dano secundário, exacerbando a lesão e contribuindo para o surgimento de uma série de distúrbios neurológicos decorrentes do trauma. Entretanto, este mesmo processo inflamatório, pode promover a reparação do tecido lesionado (Figura 1) (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; WERNER; ENGELHARD, 2007).

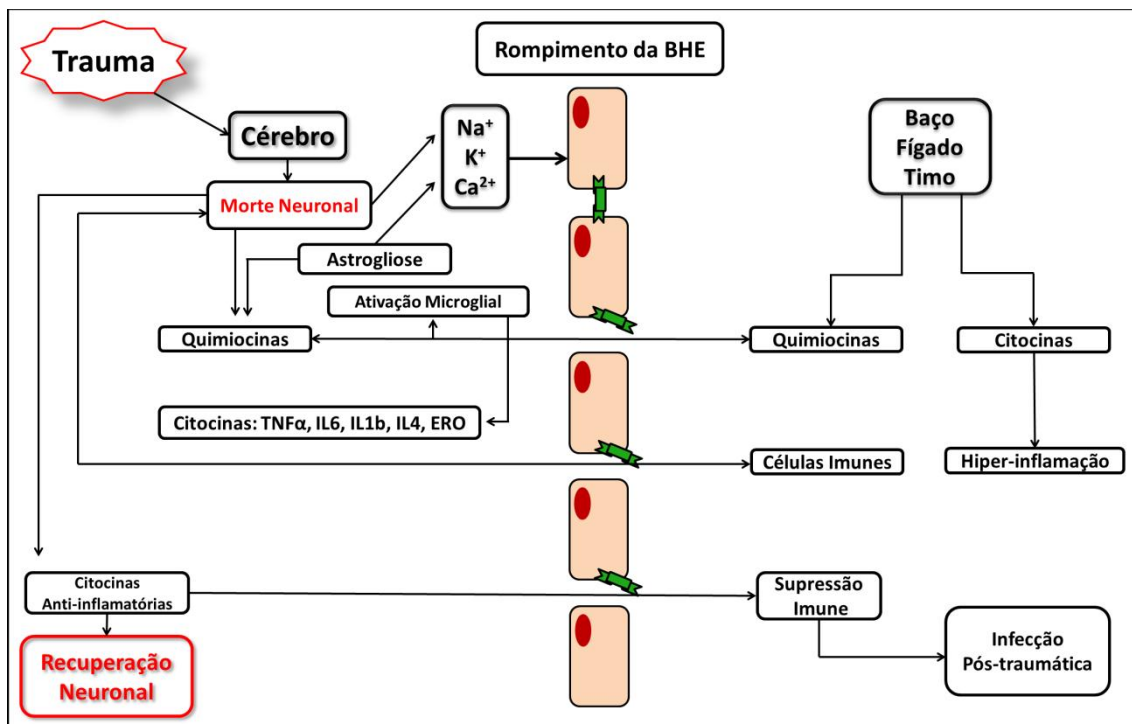


Figura 1- Interações entre o cérebro e o sistema imune periférico após o TCE. O rompimento da BHE permite a passagem de células imunes periféricas para o SNC. A interação entre o SNC e o sistema imune periférico pode levar a uma resposta de hiperinflamação ou a uma resposta de supressão imune a nível periférico. (Adaptada de DAS et al., 2012)

## 1.2. DÉFICIT MOTOR PÓS-TRAUMÁTICO

A cada ano o TCE contribui para um número substancial de mortes e casos de incapacidade permanente. Grande parte dos sobreviventes do TCE



apresenta distúrbios neurológicos que os afetam em muitas de suas atividades diárias prejudicando a qualidade de vida destes sujeitos (FAUL et al., 2007; SILVER et al., 2005). Embora a mortalidade decorrente do TCE tenha diminuído nos últimos anos, a incapacidade devido a esta lesão, está cada vez mais proeminente e, a maioria desses sobreviventes são pessoas jovens e produtivas para a sociedade (SHUKLA; DEVI; AGRAWAL, 2011). Neste contexto, o TCE resulta em uma variedade de distúrbios motores e neuropsiquiátricos que vão desde déficits sutis a graves distúrbios emocionais e intelectuais, incluindo déficits motores, déficits cognitivos, declínio emocional e epileptogênese, levando a restrição das atividades diárias dos indivíduos que o sofrem (DIKMEN et al., 2001; PITKANEN; MCINTOSH, 2006).

Neste sentido, o comprometimento motor é uma seqüela comum decorrente da lesão do TCE (SILVER et al., 2005). O sistema motor consiste em uma complexa rede de áreas corticais (áreas motoras primárias e secundárias) e subcorticais (gânglios da base e cerebelo), em que populações neuronais interagem entre si, através de mecanismos excitatórios e inibitórios (HANDLEY et al., 2009). Este sistema altamente dinâmico é influenciado por fatores externos e internos que modulam a percepção sensorial, atenção e comportamento motor (XERRI et al., 1996; ASANUMA; PAVLIDES, 1997; BREAKSPEAR; TERRY; FRISTON, 2003; HOSP; LUFT, 2011).

A lesão estrutural resultante de insultos cerebrais, assim como a lesão do TCE pode perturbar o complexo equilíbrio das vias excitatórias e inibitórias que compõem este sistema, podendo afetar diretamente as vias motoras descendentes (o trato corticoespinhal), e também áreas corticais, após acidente vascular isquêmico e TCE (FUJIMOTO et al., 2004; MURASE et al., 2004; HUMMEL; COHEN, 2005; GREFKES et al., 2008; WANG et al., 2010). (Fujimoto et al., 2004)

Neste contexto, a produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), o processo inflamatório e a morte celular estão envolvidos no mecanismo de desenvolvimento do déficit motor e cognitivo após o TCE (MCINTOSH; JUHLER; WIELOCH, 1998). Estudos mostram que muitas substâncias de caráter antioxidante apresentam a capacidade de reduzir os déficits neuromotores e de memória, bem como diminuir as lesões celulares decorrentes do TCE, como é o caso da N-acetilcisteína (ABDEL BAKI et al.,

2010), do resveratrol (SINGLETON et al., 2010) e da Vitamina E (AIGUO; ZHE; GOMEZ-PINILLA, 2010).

Além disso, sabe-se que a inflamação do SNC induzida por uma lesão cerebral é frequentemente causa de comprometimentos funcionais, contribuindo assim para a morte celular pós-lesão. De fato, estudos indicam que o tratamento com drogas que antagonizam receptores de IL-1 $\beta$  reduzem o edema pós-traumático e melhoraram a função motora (NIMMO et al., 2004; IVASHKOVA et al., 2006). Uma proteção semelhante foi encontrado em animais transgênicos com super-expressão de IL1ra, um antagonista de receptor para IL-1 (TEHRANIAN et al., 2002). Outros estudos também mostraram que a supressão da produção de TNF- $\alpha$  também reduz os danos neurológicos pós TCE (SHOHAMI; GINIS; HALLENBECK, 1999). Neste sentido, tem-se buscado métodos alternativos para controlar o aumento exacerbado da resposta inflamatória após o TCE, a fim de se obter uma diminuição nos danos motores induzidos pelo trauma.

### **1.3. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase E TCE**

A enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, também conhecida como bomba Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> (SKOU; ESMANN, 1992), é considerada uma das enzimas mais importantes da família das ATPases. Esta é uma enzima integral de membrana constituída por três cadeias polipeptídicas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo sua unidade funcional constituída pela subunidade  $\alpha$  e pela subunidade  $\beta$  (KAPLAN, 2002). A Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase tem como função realizar o transporte ativo de três íons Na<sup>+</sup> para o meio extracelular e dois íons K<sup>+</sup> para o meio intracelular, por hidrólise de uma molécula de ATP, desempenhando assim, um papel importante na manutenção do gradiente celular de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (TAKEUCHI et al., 2008; TOYOSHIMA; KANAI; CORNELIUS, 2011). Esta enzima está presente em elevadas concentrações no cérebro e consome cerca 70% de todo ATP utilizado por este tecido. Ainda, no SNC, a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e de ação e pela captação e liberação de neurotransmissores (STAHL;

HARRIS, 1986). Conseqüentemente, mudanças na atividade desta enzima podem afetar diretamente a sinalização celular, a liberação de neurotransmissores e a atividade neuronal (MOSELEY et al., 2007).

Sabe-se também, que a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é uma enzima altamente sensível ao ataque de ERs, e que seu funcionamento é mais prejudicada pelo ataque de radicais livres aos lipídios da membrana do que por alterações estruturais na proteína em si (JAMME et al., 1995). Ainda, de acordo com esta mesma ideia, Petrushanko (2006, 2007) demonstrou que variações no estado redox da célula neuronal podem modular a atividade desta enzima (PETRUSHANKO, I. et al., 2006; PETRUSHANKO, I. Y. et al., 2007). Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase pode ocasionar aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal (GRISAR; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992).

Estudos do nosso laboratório envolvendo a  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase têm evidenciado um importante papel desta enzima na fisiopatologia do TCE. No primeiro estudo, observou-se que após a indução do trauma pelo modelo de Lesão por Percussão de Flúido (LPF) os animais exibem uma inibição na atividade da  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase no período de um e três meses após o trauma (LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2009). Além disso,  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase encontra-se com sua atividade diminuída 48 horas após o TCE, e a inibição de sua atividade está associada a uma diminuição da imunorreatividade da subunidade  $\alpha 1$  desta enzima. Neste mesmo trabalho, o exercício físico prévio ao TCE protegeu destas alterações, assim como preveniu o aumento de marcadores de dano oxidativo (LIMA et al., 2009).

Diante disso, alguns estudos têm mostrado o envolvimento de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, nos mecanismos de plasticidade sináptica, tais como potenciação a longo prazo (LTP), que é um índice representativo para o estudo de modelos de aprendizagem e de memória (MEDINA; IZQUIERDO, 1995; MORRIS, 2003). No entanto, pouco se sabe da participação desta enzima no comprometimento motor decorrente de insultos como o TCE.

## **1.4. EXERCÍCIO FÍSICO**

### **1.4.1. Exercício Físico e SNC**

Os efeitos do exercício físico sobre a saúde geral são bem descritos, principalmente sobre o sistema cardiovascular e metabolismo (POWELL; PAFFENBARGER, 1985; BOOTH et al., 2002). Além disso, nas últimas décadas os efeitos benéficos da atividade física sobre o SNC têm sido evidenciados, sugerindo um papel protetor contra uma variedade de distúrbios neurológicos (HILLMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008; VAN PRAAG, 2009).

Neste sentido, estudos clínicos e epidemiológicos indicam que o exercício pode melhorar os sintomas de estresse e depressão (SALMON, 2001; BROSE et al., 2002; CALLAGHAN, 2004), o declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento (LAURIN et al., 2001; COLCOMBE et al., 2004; MCAULEY; KRAMER; COLCOMBE, 2004) e reduzir o risco de demência (FRATIGLIONI; PAILLARD-BORG; WINBLAD, 2004; LARSON et al., 2006). Em outros estudos, foi demonstrado, que o exercício físico tem a capacidade de proteger o SNC de diferentes insultos, como ablação e acidente vascular cerebral (JONES et al., 1999; KRAMER et al., 1999; COTMAN; BERCHTOLD, 2002). Além disso, o exercício físico também apresenta efeitos benéficos em uma série de modelos de doenças do SNC, tais como, Esclerose Múltipla, Doenças de Huntington, Parkinson, Alzheimer e Epilepsia (ARIDA et al., 1999; LAURIN et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; KOHL et al., 2007; BENEDETTI et al., 2009).

Estudos têm se direcionado ao entendimento das bases e mecanismos neurobiológicos destes benefícios associados ao exercício físico. Neste contexto, vários autores mostraram que o exercício físico voluntário e aeróbico forçado aumenta a expressão de fatores neurotróficos, tais como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o fator de crescimento neural (NGF) (NEEPER et al., 1995; RADAK et al., 2001; ANG et al., 2006; DING et al., 2006; DIETRICH; ANDREWS; HORVATH, 2008; GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009; VAN PRAAG, 2009). A ativação desses fatores

tróficos está relacionada com a sobrevivência e diferenciação celular, assim como também, com o aumento da resistência ao estresse oxidativo (GUO, Z. H.; MATTSON, 2000; KLUMPP; LIPOWSKY, 2005; LEEDS et al., 2005). Sabe-se também, que o exercício físico sinaliza uma cascata responsável pela biogênese mitocondrial no cérebro, principalmente pela ativação do fator nuclear PGC-1 $\alpha$ , sendo esta via importante na regulação de enzimas antioxidantes, tais como Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) (ST-PIERRE et al., 2006; STEINER; PHILBERT, 2011).

Além disto, estudos também têm mostrado que o exercício regular protege de doenças associadas com a inflamação crônica (PETERSEN; PEDERSEN, 2005), e que essa proteção pode ser mediada, em partes, pela IL-6 derivada do músculo (STEENBERG, 2003). De fato, as concentrações de IL-6 após o exercício físico podem sinalizar a expressão de citocinas antiinflamatórias, neste caso a IL-10, bem como pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  (STEENBERG, 2003). Ainda, o exercício físico apresenta efeitos profiláticos em danos cerebrais, limitando o tamanho da lesão após um evento de isquemia cerebral (ENDRES et al., 2003).

### 1.4.2. Exercício Físico e TCE

Diante das evidências dos benefícios do exercício físico ao SNC, alguns estudos também têm demonstrado que o exercício físico após o TCE modula moléculas importantes para promover a neuroplasticidade, facilitando os mecanismos de reparo endógenos e melhorando a recuperação funcional após o TCE experimental (GRIESBACH et al., 2008; GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009; ITOH et al., 2011a; b). Apesar de não existir um tratamento totalmente eficaz no combate aos problemas neurológicos decorrentes do trauma (GRIESBACH et al., 2004). Estudos em modelos animais têm evidenciado que o exercício físico apresenta forte ligação com a proteção neuronal, sendo capaz de promover a neurogênese (VAN PRAAG et

al., 1999) e melhorar a memória (SAMORAJSKI et al., 1985; FORDYCE; STARNES; FARRAR, 1991; VAN PRAAG et al., 1999).

Além disso, após o TCE causado por LPF, ratos submetidos ao exercício voluntário aumentaram BDNF, CREB e sinapsina I no hipocampo, aumento este associado com o melhor desempenho nos testes de memória e aprendizado quando comparado com animais sedentários (GRIESBACH et al., 2004). Essa melhora na função cognitiva após o TCE foi associada ao BDNF, uma vez que, bloqueando-se os receptores para o BDNF antes do exercício a melhora cognitiva não foi mais encontrada (GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009). Outro efeito neuroprotetor do exercício físico se dá por diminuir os marcadores de estresse oxidativo. Estudos demonstram que tanto o exercício físico profilático como terapêutico protege do aumento de marcadores do dano oxidativo induzidos pelo TCE (GRIESBACH et al., 2008; LIMA et al., 2009).

Além disso, o exercício durante seis semanas antes da lesão traumática por impacto cortical controlado (ICC), aumentou a sobrevivência dos neurônios do cerebelo (SEO et al., 2010). Ainda, o exercício físico prévio tem se mostrado neuroprotetor, reduzindo os níveis de citocinas, como foi observado pela diminuição do TNF- $\alpha$  em animais fisicamente treinados e submetidos à lesão cerebral isquêmica (ANG et al., 2004; DING et al., 2006). Guo e colaboradores (2008), também mostraram que o exercício físico antes de um evento isquêmico reduz a lesão cerebral, melhorando a função da BHE (GUO, M. et al., 2008). Neste contexto, o exercício físico de "pré-condicionamento" estimula uma capacidade cerebral de proteção frente a danos isquêmicos através do aumento da angiogênese, da diminuição na resposta inflamatória, da manutenção da integridade BHE, e da inibição do processo de apoptose, podendo reduzir os déficits neuronais associadas com este tipo de lesão (TSIOTOU et al., 2005). Ainda, recentemente, um estudo mostrou que o exercício físico iniciado cinco semanas após o TCE reduziu significativamente o déficit cognitivo, diminuiu o volume de lesão, e modificou o perfil inflamatório cerebral três meses após o evento traumático (PIAO et al., 2013)

Diante disto, embora existam muitos estudos que mostrem que o exercício físico pode ser útil na saúde geral e na reabilitação neurológica após a lesão cerebral traumática (ANG; GOMEZ-PINILLA, 2007; GRIESBACH;

HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009; ITOH et al., 2011a; b; PIAO et al., 2013), são poucos os trabalhos que abordam o efeito profilático do exercício físico na casacata do dano secundário decorrente de eventos de TCE (LIMA et al., 2009; SEO et al., 2010). Por isso, torna-se de extrema importância verificar os benefícios profiláticos do exercício físico sobre estes processos decorrentes do TCE.

## **1.5. OBJETIVO**

### **1.5.1. Objetivo Geral**

Verificar o papel do exercício físico prévio na resposta inflamatória aguda e no comprometimento motor induzido pelo TCE em ratos.

### **1.5.2. Objetivos Específicos**

- Verificar se o exercício físico protege do aumento nos níveis de marcadores de inflamação (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) induzido pelo TCE.
- Verificar a possível proteção do exercício físico na disfunção e no aumento da permeabilidade da BHE e nas alterações da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) induzidas pelo TCE
- Verificar a possível proteção do exercício físico diante da inibição da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase induzida pelo TCE
- Verificar se o exercício físico atenua o déficit motor, no teste de neuroscore, induzido pelo TCE.



---

---

**ARTIGO CIENTÍFICO**

## **2. ARTIGO CIENTÍFICO**

### **2.1.Exercise Pre-conditioning Reduces Brain Inflammation and Protects against Toxicity Induced by Traumatic Brain Injury: Behavioral and Neurochemical Approach.**

#### **2.1.1. Título em português**

Exercício físico prévio reduz inflamação cerebral e protege da toxicidade induzida pelo traumatismo cranioencefálico: uma abordagem neuroquímica e comportamental.

#### **2.1.2. Autores**

Bibiana Castagna Mota, Leticia Pereira, Mauren Assis Souza, Luiz Fernando Almeida Silva, Danieli Valnes Magni, Ana Paula Oliveira Ferreira, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Leidiane Mazzardo-Martins, Morgana Duarte da Silva, Adair Roberto Soares Santos, Juliano Ferreira, Michele Rechia Fighera, Luiz Fernando Freire Royes

## Exercise Pre-conditioning Reduces Brain Inflammation and Protects against Toxicity Induced by Traumatic Brain Injury: Behavioral and Neurochemical Approach

Bibiana Castagna Mota · Leticia Pereira · Mauren Assis Souza · Luiz Fernando Almeida Silva · Danieli Valnes Magni · Ana Paula Oliveira Ferreira · Mauro Schneider Oliveira · Ana Flávia Furian · Leidiane Mazzardo-Martins · Morgana Duarte da Silva · Adair Roberto Soares Santos · Juliano Ferreira · Michele Rechia Fighera · Luiz Fernando Freire Royes

Received: 23 May 2011 / Revised: 15 June 2011 / Accepted: 22 June 2011 / Published online: 7 July 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Although the favorable effects of physical exercise in neurorehabilitation after traumatic brain injury (TBI) are well known, detailed pathologic and functional alterations exerted by previous physical exercise on post-traumatic cerebral inflammation have been limited. In the present study, it is showed that fluid percussion brain injury (FPI) induced motor function impairment, followed by increased plasma fluorescein extravasation and cerebral—

inflammation characterized by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increase, and decreased IL-10. In addition, myeloperoxidase (MPO) increase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after FPI suggest that the opening of blood–brain barrier (BBB) followed by neutrophils infiltration and cerebral inflammation may contribute to the failure of selected targets leading to secondary damage. In fact, Pearson's correlation analysis revealed strong correlation of MPO activity increase with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in sedentary rats. Statistical analysis also revealed that previous running exercise (4 weeks) protected against FPI-induced motor function impairment and fluorescein extravasation. Previous physical training also induced IL-10 increase per se and protected against cerebral IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  increase and IL-10 decrease induced by FPI. This protocol of physical training was effective against MPO activity increase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after FPI. The present protection correlated with MPO activity decrease suggests that the alteration of cerebral inflammatory status profile elicited by previous physical training reduces initial damage and limits long-term secondary degeneration after TBI. This prophylactic effect may facilitate functional recovery in patients suffering from brain injury induced by TBI.

**Keywords** Traumatic brain injury · Physical exercise · Inflammation · Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

### Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a major cause of disability and death in young adults that could be present in diffuse axonal injury, neuronal cell loss, microglial activation, and

Bibiana Castagna Mota and Leticia Pereira contributed equally to this study.

B. C. Mota · L. Pereira · M. A. Souza · L. F. A. Silva · A. P. O. Ferreira · L. F. F. Royes (✉)  
Laboratório de Bioquímica do Exercício, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil  
e-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

M. A. Souza · L. F. A. Silva · D. V. Magni · A. P. O. Ferreira · M. S. Oliveira · J. Ferreira · M. R. Fighera · L. F. F. Royes  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

M. S. Oliveira · A. F. Furian  
Universidade Federal do Pampa—Campus Itaqui, Itaqui, RS 97650-000, Brazil

M. R. Fighera  
Instituto do Cérebro, Serviço de Neurologia, Hospital São Lucas, PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brazil

L. Mazzardo-Martins · M. D. d. Silva · A. R. S. Santos  
Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

intraparenchymal hemorrhage in cortical regions (Dixon et al. 1991; Chen and Swanson 2003; Fujimoto et al. 2004). In this context, the early inflammatory response after tissue injury is believed to be triggered from several factors, such as extravasated blood products, intracellular compounds, and reactive species generation (Mathew et al. 1994; Juliet et al. 2008). Post-traumatic cerebral inflammation is characterized by glial activation, leukocyte recruitment, upregulation, and secretion of mediators, such as cytokines. In fact, alterations in systemic and cerebral spinal fluid (CSF) concentrations of cytokines have been reported in human patients and experimental models following severe head injury (Fan et al. 1995; Kossmann et al. 1995; Csuka et al. 1999). Leukocytes influx to the inflammatory site is orchestrated by a sequential upregulation of adhesion molecules on vascular endothelium leading to post-traumatic edema and blood–brain barrier (BBB) breakdown (Baskaya et al. 1997; Unterberg et al. 1997). In addition, it increased cerebral tissue water content and BBB dysfunction after TBI causing delayed neuronal dysfunction and death through secondary processes involving increased amino acids excitatory levels and loss of ionic equilibrium (Lenzlinger et al. 2004; Shlosberg et al. 2010).

The ion pump  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is a ubiquitous plasma membrane protein which plays a key role in intracellular electrolyte homeostasis maintenance in virtually all tissues (Skou and Esmann 1992). In the Central Nervous System, decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as the whole animal behavior (Lees et al. 1990; Jamme et al. 1995; Li and Stys 2001). In this context, experimental findings have suggested that TBI-induced reactive oxygen species (ROS) generation decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity by decreasing the total number of enzyme molecules while physical exercise protects against this effect (Lima et al. 2008).

Maintaining brain health and plasticity throughout life is an important public health goal and thus, beneficial effects of exercise on the brain are becoming increasingly evident (Ang and Gomez-Pinilla 2007). Cross-sectional studies also have suggested that regular exercise protects against diseases associated with chronic low-grade system inflammation (Petersen and Pedersen 2005) and that this effective protection may be partly mediated, by muscle-derived IL-6 (Steensberg 2003). In fact, physiological IL-6 concentrations after physical exercise stimulate the appearance of the anti-inflammatory cytokines IL-1 receptor antagonist (IL-ra) and IL-10 as well as inhibit the production of the pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the circulation (Steensberg et al. 2003). Moreover, altering the inflammatory status, profile performing exercise before brain trauma also produces prophylactic effects on attendant brain damage, such as limiting the infarct size following forebrain ischemia (Endres et al. 2003).

Central Nervous System inflammation induced by brain injury is commonly believed to cause sustained functional impairment and contribute to post-injury cell death. Indeed, studies indicated that treatment with drugs that antagonize endogenous inflammatory mediators reduces post-injury edema and improves motor function (Nimmo et al. 2004; Ivashkova et al. 2006). Although it is believed that physical exercise on general health and neurorehabilitation after TBI may be useful (Ang and Gomez-Pinilla 2007), little information is available regarding the prophylactic role of physical exercise on deleterious effects induced by TBI (Lima et al. 2008). Therefore, it was investigated whether events, such as acute inflammatory response (IL-1; IL-6; IL-10 TNF- $\alpha$ ), myeloperoxidase (MPO, neutrophil infiltration indicator), and BBB breakdown are involved in fluid percussion brain injury (FPI)-induced motor function impairment and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition. Furthermore, it was investigated whether previous aerobic physical training prevents against these deleterious effects elicited by FPI.

## Materials and Methods

### Animal and Reagents

All experiments involving animals were conducted in compliance with the policy statement of the American College of Sports Medicine and policy statement of the European Communities Council Directive (86/609/EEC), and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort. In the present study, 90-day-old male Wistar rats, weighing 220–260 g at the beginning and 270–320 g at the end of the experimental period were used. During this period, animals were maintained in controlled environment (12:12 h light:dark cycle,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimizing their suffering. Reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### Physical Training Procedure

The physical training was carried out according to the protocol described by Arida and collaborators (2007). Before surgical procedure, animals were familiarized with the apparatus for 3 days by placing them on a treadmill (Insight Instruments) for 10 min/day at 10 m/min and 0% inclination degree. To provide a trainability measure, each animal's treadmill performance was rated on a scale of 1–5 according Dishman et al. (1988). After 4 weeks of training,

a test protocol was employed to determine the lactate threshold (LT) in sedentary ( $n = 6$ ) and trained rats ( $n = 6$ ). The LT test was carried out according to the protocol described by Marquezi and collaborators (2003).

#### Traumatic Brain Injury

After 4 weeks of training, sedentary and trained rats underwent FPI. Rats assigned to sham groups were anesthetized and connected to the injury device, but receiving no injury. The FPI was carried out as previously described (D'Ambrosio et al. 1999, 2004). In brief, animals were anesthetized with a single i.p. injection of Equithesin (6 ml/kg), a mixture containing sodium pentobarbital (58 mg/kg), chloral hydrate (60 mg/kg), magnesium sulfate (127.2 mg/kg), propylene glycol (42.8%), and absolute ethanol (11.6%) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. A 3-mm-diameter burr hole was drilled on the right convexity, 2 mm posterior to the bregma and 3 mm lateral to the midline, taking care to keep the dura mater intact. A plastic injury cannula was placed over the craniotomy with dental cement. When dental cement has hardened, the cannula was filled with Chloramphenicol, closed with a proper plastic cap and the animal removed from the stereotaxic device and returned to its homecage. After 24 h, animals were anesthetized with Isoflurane and had the injury cannula attached to the fluid percussion device and placed in a heatpad maintained at  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . The TBI was produced by a fluid-percussion device developed in our laboratory. A brief (10–15 ms) transient pressure fluid pulse ( $3.53 \pm 0.17$  atm) impact was applied against the exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (Fluid Control Automação Hidráulica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Tektronix TDS 210). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of FPI. Immediately after these procedures, the cannula was removed, and the orifice was covered with dental cement. Naive rats underwent randomization with no further intervention.

#### Motor Function Assessment

The neuroscore (NS) test was employed to assess motor function at 24 h post-injury or sham-injury. The NS test was performed based on McIntosh et al. (1989). In brief, animals were allowed to walk on an open wire grid for 3 min, during which a qualitative assessment of the number of foot-faults was performed to establish whether an observable motor deficit was present, defined as the inability of the animal to immediately retract its paw after falling through the grid. This evaluation (deficit/no deficit) has been shown to sensitively detect both forelimb and

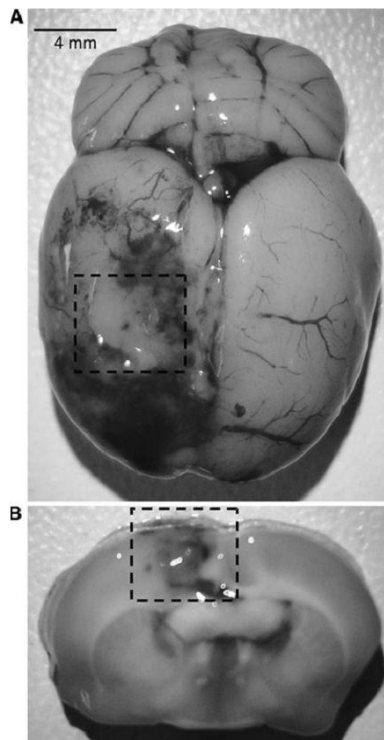
hindlimb deficits (Laurer et al. 2001). Subsequently, forelimb and hindlimb functions were evaluated by suspending the animals by the tail and observing how the animal grasps the top of the cage when they are lowered toward it (for the forelimbs) and the pattern of toespread and hindlimb extension during the suspension (for hindlimbs). Finally, the animals were tested for vestibulomotor function using a wire-grip test accordingly (Hall et al. 1988). Rats were placed on a metal wire 40 cm long, suspended 40 cm above a foam mat between 2 vertical bars, and introduced to the wire so that both front paws came in contact with the wire, and there was equal chance at grasping the wire. The latency that a rat remained on the wire within a 60-s interval was measured. Animals were scored from 4 (normal) to 0 (severely impaired) for each of the following indices, and the maximum score for each animal was 12.

#### Tissue Processing for Analysis of MPO, $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase Activity and Cytokine Levels

Considering that the early inflammatory activation after tissue injury exerts adverse effects on synaptic function and neuronal plasticity (Cederberg and Siesjö 2010), animals were killed by decapitation 24 h after TBI, and a coronal section (7 mm, Fig. 1) of the injured hemisphere corresponding to the injury impact site was dissected. Tissue was homogenized in solution containing bovine serum albumin (BSA 10 mg/ml), EGTA (2 mM), EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). After homogenization, the sample was centrifuged ( $3,000 \times g$  for 10 min) and cytokine levels measured using a commercially available ELISA Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN). The detection limit was 15 pg/ml. Assay of MPO and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activities were performed according to Suzuki et al. (1983) and Wyse et al. (2000), respectively. Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using BSA (1 mg/ml) as standard.

#### BBB Permeability Assay Using Fluorescein

For evaluation of BBB permeability to small molecular mass compounds in rats, a subset of animals were injected with 10 mg sodium fluorescein in 0.1 ml sterile saline, i.p. administered (Olsen et al. 2007). In brief, animals were anaesthetized with ketamine HCl (100–200 mg/kg) i.p. 45 min after sodium fluorescein injection for blood sampling. Transcardial perfusion with PBS was performed, and then, the brain was removed, weighed, homogenized in 1-ml sterile PBS, and then stored at  $-70^\circ\text{C}$  until processed further. Protein was precipitated from brain and serum samples with trichloroacetic acid (TCA) and diluted in sterile PBS 1:10 before adding 1:10 dilution in 20% TCA.

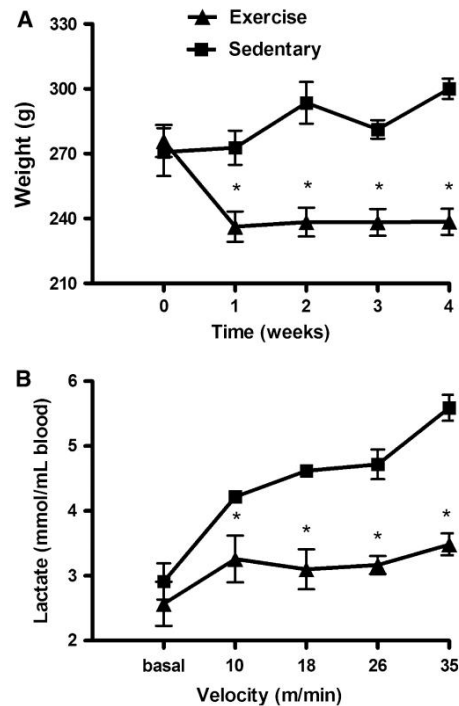


**Fig. 1** Scheme of dorsal and coronal view of contusion site and pericontusional cortical tissue that was collectively sampled for the current study

Brain samples were first centrifuged at 1,250 g for 5 min, after which the resulting supernatant was diluted 1:10 in 20% TCA. All samples were incubated at 4°C for 24 h. Samples were centrifuged at 10,000 g for 15 min to remove precipitated protein. The supernatant was removed and diluted with equal volumes of borate buffer (0.05 M, pH 10), resulting in a 10% TCA final concentration and 0.025 M buffer borat. Samples were analyzed on fluorometer. BBB permeability degree was measured as the percentage (w/v) of sodium fluorescein per amount of sodium fluorescein in a milliliter of serum.

**Statistical Analyses**

Statistical analyses were carried out by one or two-way analyses of variance (ANOVA), Kruskal–Wallis test, and Pearson’s correlation. Values of *F* and *H* are only presented



**Fig. 2** Effect of 4-week treadmill exercise on body weight (a) and LT assay (b). Mean ± SEM for *n* = 6–8 in each group. \**P* < 0.05 compared with sedentary group (*F* test for simple effect) (two-way ANOVA)

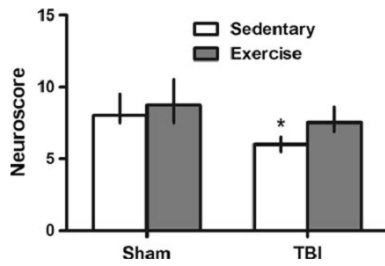
if *P* < 0.05. Post-hoc analyses were carried out, while appropriately using the Student–Newman–Keuls test. Data were expressed as mean ± SEM or mean ± inter quartile.

**Results**

In the present study, significant increase in the total body weight (mean = 300 g) in sedentary versus trained rats (mean = 230 g) along the 4 weeks of physical training [*F*(4,56) = 7.01; *P* < 0.05; Fig. 2a] are shown. Statistical analyses also showed a clear stabilization of blood lactate concentration in the trained group compared with that of the sedentary [*F*(4,40) = 4.39; *P* < 0.05; Fig. 2b], indicating that the training program increased animal’s aerobic resistance.

Using the composite NS, there were no pre-injury, baseline deficits among any of the groups (data not shown). On



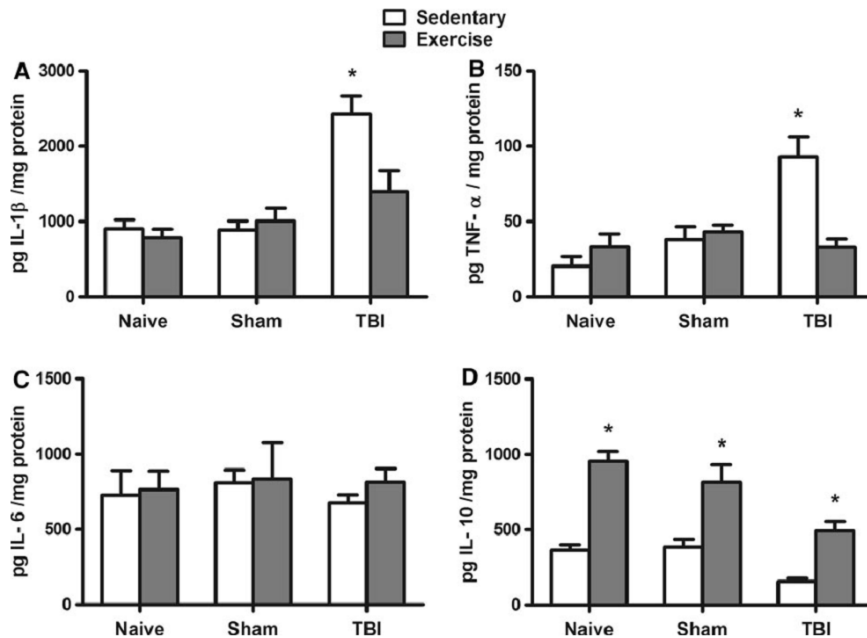


**Fig. 3** Effects of physical exercise and TBI on motor function. Mean  $\pm$  inter quartile for  $n = 8-9$  in each group \* $P < 0.001$  compared to TBI + sed and sham groups (Kruskal–Wallis test)

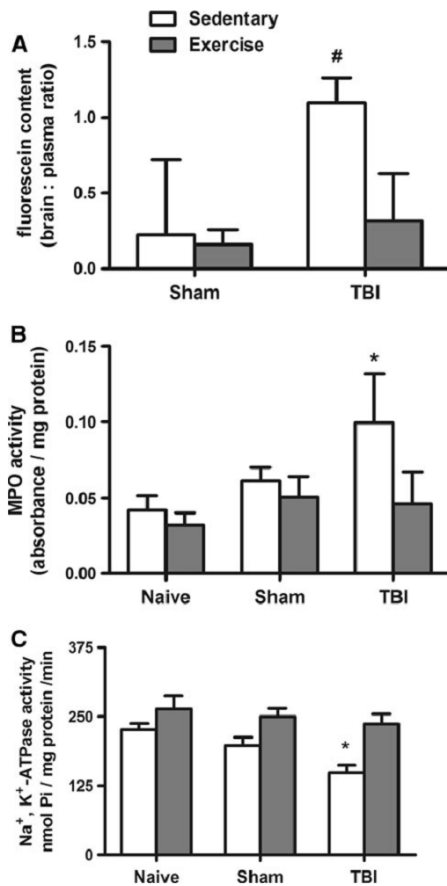
the other hand, 24 h after FPI, brain-injured sedentary rats showed significant neurological deficits compared with sham-injured controls [ $H(3) = 22.73; P < 0.001$ ; Fig. 3]. In addition, previous physical training protected against FPI-induced motor impairment. This study also showed that FPI induced the increase of IL-1 $\beta$  [ $F(2,39) = 20.35; P < 0.002$ ; Fig. 4a] and TNF- $\alpha$  [ $F(2,39) = 9.05; P < 0.05$ ; Fig. 4b]

levels, despite not having increased IL-6 [ $F(2,39) = 2.22; P > 0.05$ ; Fig. 4c], and FPI having decreased IL-10 levels [ $F(2,39) = 16.14; P < 0.05$ ; Fig. 4d]. Statistical analysis also revealed that the chronic physical training induced IL-10 increase per se [ $F(2,39) = 36.41; P < 0.001$ ; Fig. 4d] and protected against FPI-induced IL-10 decrease [ $F(2,39) = 2.41; P < 0.05$ ; Fig. 4d]. Previous physical training also protected against the FPI-induced IL-1 $\beta$  [ $F(2,39) = 5.49; P < 0.05$ ; Fig. 4a] and TNF- $\alpha$  [ $F(2,39) = 11.00; P < 0.002$ ; Fig. 4b] accumulation.

Furthermore, the statistical analysis showed that physical exercise significantly attenuated FPI-induced increase of plasma fluorescein extravasation (BBB breakdown indicator) [ $F(1,15) = 5.95; P < 0.05$ ; Fig. 5a] and protected against MPO activity increase [ $F(2,36) = 8.24; P < 0.001$ ; Fig. 5b] as well Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition [ $F(2,36) = 4.74; P < 0.05$ ; Fig. 5c]. Correlation analysis (Pearson's correlation) showed that MPO activity increases in correlation with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in sedentary rats ( $r = -0.979; P < 0.002$ ; Fig. 6). On the other hand, the negative correlation between MPO and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activities in animals



**Fig. 4** Effects of physical exercise and TBI on the IL-1 $\beta$  content (a), TNF- $\alpha$  content (b), IL-6 content (c), and IL-10 content (d). \* $P < 0.05$  compared to sham and naive group. Mean  $\pm$  SEM for  $n = 8$  in each group (Student–Newman–Keuls test)

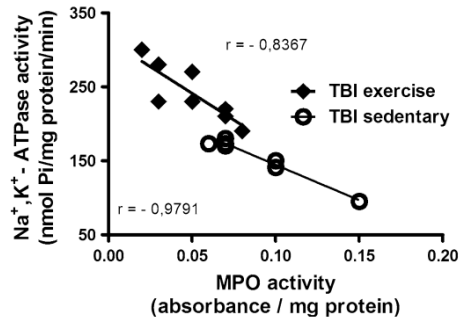


**Fig. 5** Effects of physical training and TBI on the BBB breakdown (a), on the MPO activity (b), and on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity (c). Mean ± SEM for n = 4–8 in each group. <sup>#</sup>P < 0.001 compared to TBI + sed and sham group (two-way ANOVA) and <sup>\*</sup>P < 0.05 compared to sham (Student–Newman–Keuls test)

trained after FPI ( $r = -0.838$ ;  $P < 0.007$ ; Fig. 6) suggests FPI-induced neutrophil infiltration leads to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and that previous physical exercise protects against such effect.

**Discussion**

In the present study, we showed that FPI induced severe motor impairment followed by the increase in both cerebral



**Fig. 6** Pearson's correlation coefficient between Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and MPO activities after FPI in sedentary and exercise groups. Data are individual values for n = 8 in each group (Pearson's correlation)

interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels and decrease in IL-10 without altering IL-6 levels. These findings are consistent with previous studies that show TBI causes severe motor impairment (Marklund et al. 2009; Chow et al. 2010; Costa et al. 2010) BBB opening and brain function disturbance characterized by TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and ROS generation (Abbott et al. 2006). On the other hand, this experimental protocol revealed that FPI did not alter IL-6 levels when analyzed 24 h after neural injury. Although IL-6 has been widely used as severity marker of inflammatory response in many clinical trials (Lenz et al. 2007), the role of IL-6 in TBI pathophysiology is not completely defined. While some authors suggest that this cytokine plays regulatory effect upon the inflammatory response (Hammacher et al. 1994) by releasing soluble IL-1ra (Tilg et al. 1994), others reveal that IL-6 increase in CSF is associated with increased acute phase proteins (C-reactive protein, fibrinogen, and  $\alpha$ 1-antitrypsin), with severe BBB dysfunction (Kossmann et al. 1995). The determining factor for such a discrepancy is not known, but one might argue that methodological differences may account for it or the possible dual role exerted by this cytokine. However, further in-depth studies are necessary to establish the mechanism involved.

Since TBI is one of the most common neurologic disorders causing disability (Fujimoto et al. 2004), detailed information about motor recovery is essential for brain rehabilitation because it enables us to establish scientific rehabilitative strategies and predict motor outcome (Jang 2009). In this context, acute damage to the Central Nervous System has been recently associated with immunodeficiency and impaired cell-mediated immunity which may predispose patients to infection (Meisel et al. 2005). Furthermore, the severe motor impairment and disturbance of brain function after TBI in the present study agree with previous studies that



have demonstrated that superimposition of inflammatory process results in worsening of post-injury mortality and weight loss, significant exacerbation of post-injury motor deficit, and cognitive impairments (Venturi et al. 2009).

In the present study, we also confirmed and extended our previous findings that a single FPI decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (Lima et al. 2009) and showed the involvement of the neutrophil infiltration (here characterized by MPO activity increase) and generation of inflammatory processes in the collapses of ion gradient homeostasis for the first time. In addition, Pearson's correlation analysis revealed strong correlation of MPO activity increase with  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition in sedentary rats. This experimental body of evidence suggests that secondary injury mechanisms including inflammation are believed to participate in the TBI pathophysiology here characterized by severe motor impairment. In fact, published data have demonstrated that TBI initiates a complex pattern of acute inflammatory events that may either aggravate outcome or reparative processes (Lucas et al. 2006).

Furthermore, it is important to point out that FPI-induced MPO activity increases in cortical tissues surrounding the injured tissue agreeing with the view that the hallmarks of early brain inflammation injured after TBI include activated microglia and presence of neutrophils (Potts et al. 2006). Thus, results presented in this report suggest that neutrophils infiltration induced by FPI may contribute to the failure of select targets leading to secondary damage. The correlation of MPO activity increase with  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition in sedentary rats also strongly reinforces the assumption that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase may represent one of these targets since it is the main factor responsible for maintaining ion gradients across plasma membranes (Ang and Gomez-Pinilla 2007). In agreement with this view, we have demonstrated that a single FPI episode in rat parietal cortex decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity with concomitant increase in the levels of oxidative stress markers (Lima et al. 2008). Accordingly,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition is elicited by prostaglandin  $\text{E}_2$  (Oliveira et al. 2009) suggesting that the major prostaglandin lipid mediators of inflammation may increase brain excitability and thus, contribute to a variety of inflammatory responses including TBI.

Recently, a considerable set of evidence support the notion that inflammation action may differ in the acute and delayed phase after TBI, and maintaining limited inflammation is essential for repair (Ziebell and Morganti-Kossmann 2010). In this context, favorable changes in the profile of cerebral anti-inflammatory status (IL-10 increase) elicited by previous physical training may exert prophylactic effect on FPI-induced inflammatory response characterized by increased IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  levels, MPO activity, and BBB

breakdown. Moreover, the significant protection exerted by the physical exercise against FPI-induced  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition suggests that the adaptive responses to regular and moderate endurance exercise protects against the failure of some selected targets, such as  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase enzyme in this TBI model. Results presented in this report demonstrated that previous physical training reduced the trauma-induced motor disability and release of pro-inflammatory mediators. Considering that motor function is mediated by a complex system of neural networks originating in the cortex and terminating in skeletal muscle (Hamm 1990), it is plausible to propose that any interference with secondary injury development induced by previous physical training can attenuate the disruption of this complex motor pathway in this TBI model. The negative correlation between the activities of MPO and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase enzymes in animals trained after FPI reinforces this idea and suggest that previous physical exercise protects against FPI-induced neutrophil infiltration and subsequent  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition. This effective profile alteration of cerebral inflammatory status elicited by previous aerobic physical training (Woods 2005) may reduce initial damage and limit long-term secondary degeneration after TBI (Lenzlinger et al. 2004; Shlosberg et al. 2010).

Although a pre-injury regimen for humans may not be the most effective treatment since the injury time cannot be predicted, the effective protection exerted by physical activity in this TBI model is particularly interesting since it supports the assumption that physical activity alters neuronal functions and thus, delays or prevents secondary cascades that lead to long-term cell damage and neurobehavioral disability after TBI (Stahel et al. 2000). Another emerging finding is that, contrary to the transient proinflammatory effect found after a single exercise bout, regularly performed exercise or physical activity seems to have anti-inflammatory effect (Petersen and Pedersen 2005; Woods 2005). In this context, Funk et al. (2011) have demonstrated that voluntary exercise elevates hippocampal IL-6 offering protection against chemical-induced hippocampal injury associated with TNF receptor activation (Funk et al. 2011). Clinical studies suggest that a reduction in brain inflammation underlies positive effects of exercise on cognitive functioning in patients suffering from neurodegenerative disease or acute brain injury (Erickson et al. 2007). In addition, the down-regulation of TNF signaling is associated with the exercise amelioration of cognitive declines in the aged, and (van Praag et al. 2005; Nichol et al. 2008; Parachikova et al. 2008) in a model of ischemia/reperfusion, exercise preconditioning protects against damage in the brain via TNF $\alpha$  signal transduction pathway and TNF receptor (TNFR) down-regulation (Ding et al. 2006). Given the evidence that inflammation underlies the pathophysiology in many disease states (Black 2003),

results presented in this report highlight a new mechanism whereby physical exercise may be exerting its beneficial effects on disease outcome.

It is also important to point out that a significant increase in total body weight in sedentary versus trained rats was observed along 4 weeks of treadmill training. The difference in body weight between sedentary and trained rats may be explained by changes in body composition. For instance, decrease in subcutaneous adipose tissue of trained rats may explain why body mass was lower in this group. Since we have not determined body composition in the present study, this explanation remains speculative in nature and further studies are necessary to determine the mechanisms involved. In addition, the clear stabilization of blood lactate concentration in the trained group compared with the sedentary group for LT assay suggests that the training program increased aerobic resistance of animals (Gobatto et al. 2001).

In conclusion, results presented in this report revealed that alterations in the profile of cerebral inflammatory status after FPI are involved in the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition. In addition, aerobic training exerts prophylactic effect in this TBI model by the enhancement of endogenous anti-inflammatory (IL-10), inhibition of neutrophil (MPO) infiltration, attenuating BBB breakdown, pro-inflammatory (IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ ) accumulation, and neuro-motor impairment. Considering that inflammatory events together with cytotoxic effects of immune mediators lead to injured brain, physical training may be a new therapeutic approach to control acute inflammation that lead to long-term cell damage and neurobehavioral disability after TBI.

## References

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53
- Ang ET, Gomez-Pinilla F (2007) Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem* 14:2564–2571
- Arida RM, Scorza FA, de Lacerda AF, Gomes da Silva S, Cavalheiro EA (2007) Physical training in developing rats does not influence the kindling development in the adult life. *Physiol Behav* 90:629–633
- Baskaya MK, Rao AM, Dogan A, Donaldson D, Dempsey RJ (1997) The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 226:33–36
- Black PH (2003) The inflammatory response is an integral part of the stress response: implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav Immun* 17:350–364
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cederberg D, Siesjo P (2010) What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst* 26:221–226
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137–149
- Chow JW, Yablon SA, Horn TS, Stokic DS (2010) Temporospatial characteristics of gait in patients with lower limb muscle hypertonia after traumatic brain injury. *Brain Inj* 24:1575–1584
- Costa T, Constantino LC, Mendonca BP, Pereira JG, Herculano B, Tasca CI, Boeck CR (2010) *N*-methyl-D-aspartate preconditioning improves short-term motor deficits outcome after mild traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Res* 88:1329–1337
- Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T (1999) IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 101:211–221
- D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D (1999) Impaired  $\text{K}^+$  homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci* 19:8152–8162
- D'Ambrosio R, Fairbanks JP, Fender JS, Born DE, Doyle DL, Miller JW (2004) Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain* 127:304–314
- Ding YH, Mrizek M, Lai Q, Wu Y, Reyes R Jr, Li J, Davis WW, Ding Y (2006) Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF- $\alpha$  receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Curr Neurovasc Res* 3:263–271
- Dishman RK, Armstrong RB, Delp MD, Graham RE, Dunn AL (1988) Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiol Behav* 43:541–546
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39:253–262
- Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003) Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54:582–590
- Erickson KI, Colcombe SJ, Elavsky S, McAuley E, Korol DL, Scalf PE, Kramer AF (2007) Interactive effects of fitness and hormone treatment on brain health in postmenopausal women. *Neurobiol Aging* 28:179–185
- Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK (1995) Experimental brain injury induces expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 30:125–130
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK (2004) Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28:365–378
- Funk JA, Gohlke J, Kraft AD, McPherson CA, Collins JB, Jean Harry G (2011) Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun* (in press). doi:10.1016/j.bbi.2011.03.012
- Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E (2001) Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:21–27
- Hall ED, Yonkers PA, McCall JM, Braugher JM (1988) Effects of the 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg* 68:456–461
- Hamm TM (1990) Recurrent inhibition to and from motoneurons innervating the flexor digitorum and flexor hallucis longus muscles of the cat. *J Neurophysiol* 63:395–403

- Hammacher A, Ward LD, Weinstock J, Treutlein H, Yasukawa K, Simpson RJ (1994) Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Sci* 3:2280–2293
- Iwashkova Y, Svetitsky A, Mayzler O, Pruneau D, Benifla M, Fuxman Y, Cohen A, Artru AA, Shapira Y (2006) Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. *J Trauma* 61:879–885
- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (1995) Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333–337
- Jang SH (2009) Review of motor recovery in patients with traumatic brain injury. *Neurorehabilitation* 24:349–353
- Juliet PA, Mao X, Del Bigio MR (2008) Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. *Brain Res* 1210:230–239
- Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C (1995) Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 4:311–317
- Laurer HL, Bareyre FM, Lee VM, Trojanowski JQ, Longhi L, Hoover R, Saatman KE, Raghupathi R, Hoshino S, Grady MS, McIntosh TK (2001) Mild head injury increasing the brain's vulnerability to a second concussive impact. *J Neurosurg* 95:859–870
- Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A (1990) The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 120:159–162
- Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG (2007) Systemic inflammation after trauma. *Injury* 38:1336–1345
- Lenzinger PM, Saatman KE, Hoover RC, Cheney JA, Bareyre FM, Raghupathi R, Arnold LD, McIntosh TK (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats. *Restor Neurol Neurosci* 22:73–79
- Li S, Stys PK (2001) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107:675–683
- Lima FD, Souza MA, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Martignoni FV, Hoffmann MS, Figuera MR, Royes LF, Oliveira MS, de Mello CF (2008) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res* 193:306–310
- Lima FD, Oliveira MS, Furian AF, Souza MA, Rambo LM, Ribeiro LR, Silva LF, Retamoso LT, Hoffmann MS, Magni DV, Pereira L, Figuera MR, Mello CF, Royes LF (2009) Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res* 1279:147–155
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1):S232–S240
- Marklund N, Morales D, Clausen F, Hanell A, Kiwanuka O, Pitkanen A, Gimbel DA, Philipson O, Lannfelt L, Hillered L, Strittmatter SM, McIntosh TK (2009) Functional outcome is impaired following traumatic brain injury in aging Nogo-A/B-deficient mice. *Neuroscience* 163:540–551
- Marquezi ML, Roschel HA, dos Santa Costa A, Sawada LA, Lancha AH Jr (2003) Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 13:65–75
- Mathew P, Graham DL, Bullock R, Maxwell W, McCulloch J, Teasdale G (1994) Focal brain injury: histological evidence of delayed inflammatory response in a new rodent model of focal cortical injury. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:428–430
- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL (1989) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28:233–244
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6:775–786
- Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (2008) Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflamm* 5:13
- Nimmo AJ, Cernak I, Heath DL, Hu X, Bennett CJ, Vink R (2004) Neurogenic inflammation is associated with development of edema and functional deficits following traumatic brain injury in rats. *Neuropeptides* 38:40–47
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416–426
- Olsen AL, Morrey JD, Smee DF, Sidwell RW (2007) Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res* 75:104–112
- Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW (2008) Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis* 30:121–129
- Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98:1154–1162
- Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Haueslein LJ (2006) Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 3:143–153
- Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A (2010) Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 6:393–403
- Skou JC, Esmann M (1992) The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24:249–261
- Stahel PF, Kariya K, Shohami E, Barnum SR, Eugster H, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC (2000) Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* 109:164–172
- Steensberg A (2003) The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. *Exerc Immunol Rev* 9:40–47
- Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK (2003) IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E433–E437
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T (1983) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132:345–352
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83:113–118
- Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Pauser S, Vollmann W (1997) Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70:106–108
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685
- Venturi L, Miranda M, Selmi V, Vitali L, Tani A, Margheri M, De Gaudio AR, Adembri C (2009) Systemic sepsis exacerbates mild post-traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 26:1547–1556

- Woods JA (2005) Physical activity, exercise, and immune function. *Brain Behav Immun* 19:369–370
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M (2000) Methylmalonate administration decreases  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–2334
- Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC (2010) Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7:22–30

---

---

**DISCUSSÃO**

### **3. DISCUSSÃO**

O TCE é uma epidemia silenciosa que afeta profundamente as pessoas que o sofrem, seus familiares, e a sociedade (SILVER et al., 2005). Neste sentido, uma variedade de distúrbios motores e neurológicos estão associados ao TCE (FUJIMOTO et al., 2004). Em 80-90% desses indivíduos, os problemas neurológicos podem ser reestabelecidos dentro de dias até semanas após a lesão (ALEXANDER, 1995; D'HEMECOURT, 2011). No entanto, em 10-20% dos pacientes, estes problemas neuropsicológicos podem persistir por meses (RUFF; CAMENZULI; MUELLER, 1996), levando a restrição de suas atividades diárias e ocasionando uma perda substancial na qualidade de vida destes indivíduos.

Como em outros tecidos, o trauma ao SNC induz uma resposta inflamatória. Paradoxalmente, o evento inflamatório pode levar tanto a uma melhora como a um agravamento do dano tecidual. Cabe salientar que a relativa impermeabilidade, proporcionada pela BHE, protege o tecido neural contra a infiltração de componentes celulares e moleculares da resposta inflamatória durante condições fisiológicas. Porém, sob condições inflamatórias, células imunes podem atravessar a BHE, uma vez, que sua permeabilidade esta diminuída (DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012)

Os resultados apresentados no presente estudo revelaram que TCE levou a um comprometimento motor, vinte e quatro horas após a lesão, juntamente com o aumento nos níveis cerebrais de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$ , e da diminuição nos níveis de IL-10. Estes achados corroboram com prévios estudos que demonstram um comprometimento motor (MARKLUND et al., 2009; CHOW et al., 2010), bem como elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e modificação no estado redox cerebral após lesão traumática (GOPCEVIC et al., 2007; LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2009).

No entanto, não observamos modificações nos níveis de IL-6. Os dados acerca desta citocina ainda são um tanto quanto controversos na literatura (VAN WAGONER; BENVENISTE, 1999). Enquanto alguns estudos mostram que os níveis de IL-6 estão acentuados no SNC em resposta à lesão cerebral (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; LENZ; FRANKLIN; CHEADLE, 2007),



outros não associam os níveis desta citocina a um comprometimento da função neurológica bem como volume de lesão após dano isquêmico (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006). Este efeito divergente da IL-6 pode estar relacionado com seu efeito regulatório, uma vez que está associada com a indução de diversas citocinas pro inflamatórias, e também com a liberação do antagonista de receptores para estas citocinas (HAMMACHER et al., 1994; TILG et al., 1994; LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006). O motivo para tal discrepância não está totalmente estabelecido e, portanto, estudos mais aprofundados são necessários para estabelecer os mecanismos envolvidos.

Os resultados obtidos neste trabalho também evidenciaram um aumento na permeabilidade da BHE, caracterizado pelo aumento no extravasamento de fluoresceína do plasma para o cérebro, vinte e quatro horas após o TCE. Sabendo que a BHE possui um importante papel na seletividade de compostos para o cérebro, qualquer lesão que ocasione uma disfunção ou rompimento da mesma acarretará em aumento da permeabilidade e diminuição desta seletividade. Neste sentido é possível sugerir que uma disfunção na permeabilidade da BHE pode ser um dos fatores limitantes na progressão da lesão, da perda neuronal bem como das alterações das funções cerebrais, caracterizadas neste estudo pela deficiência motora (NEUWELT et al., 2008; CHODOBSKI; ZINK; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011). Esta disfunção na BHE tem como consequência um aumento da permeabilidade de moléculas da corrente sanguínea para o cérebro, facilitando desta forma, a infiltração de células do sistema imune para o SNC após uma lesão cerebral.

De fato, estudos mostram que o TCE leva a ativação da microglia e aumento da infiltração de neutrófilos para o SNC (POTTS et al., 2006). Além disso, nossos achados corroboram com esta ideia, uma vez que o TCE induziu um aumento na atividade da enzima MPO. Cabe salientar que esta enzima está presente exclusivamente em neutrófilos e é amplamente utilizada como marcador de infiltração destas células para locais lesionados em decorrência do início de um evento inflamatório, bem com marcadora de lesão tecidual, por ser altamente produtora de EROs (ABBAS et al., 2011). Assim, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a infiltração de neutrófilos induzida pela LPF, pode contribuir para a falha de alvos seletivos, levando a danos secundários.

No presente estudo foi evidenciada também, uma significativa correlação entre o aumento da atividade da enzima MPO com a inibição na enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, em ratos sedentários. Estes achados experimentais reforçam a suposição de que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode representar um desses alvos, uma vez que a mesma é altamente suscetível ao ataque de radicais livres e responsável pela manutenção de gradientes de íons através das membranas plasmáticas (ANG; GOMEZ-PINILLA, 2007). Além disso, estudos do nosso laboratório evidenciaram uma inibição na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase com concomitante aumento nos níveis de marcadores de estresse oxidativo (LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2009). Esta relação entre inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e aumento de estresse oxidativo, pode ser uma possível elucidação para a correlação encontrada no nosso trabalho entre o aumento da atividade da MPO e a inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em ratos sedentários após o TCE. Diante disto, as modificações comportamentais e bioquímicas encontradas no nosso estudo estão de acordo com prévios estudos que sugerem um envolvimento do processo inflamatório no comprometimento motor e cognitivo após TCE (VENTURI et al., 2009).

O aumento da mortalidade bem como da morbidade induzidas pelo trauma deixa alguns questionamentos, principalmente no que se refere às características e duração das incapacidades resultantes do TCE. Estas alterações influenciam quantitativamente e qualitativamente o processo de recuperação. Neste sentido, diferentes intervenções têm sido realizadas para tentar minimizar o dano secundário e conseqüentemente diminuir os déficits neurológicos decorrentes do TCE. Uma destas intervenções são os programas de exercício físico que têm apresentado efeito protetor diante de diversos insultos ao SNC uma vez que modifica o estado inflamatório bem como o estado redox cerebral (GRIESBACH et al., 2008; LIMA et al., 2008; ARIDA et al., 2009; SEO et al., 2010).

De fato, nossos resultados mostraram que quatro semanas de exercício físico prévio protegeu do aumento nos níveis de  $\text{IL-1}\beta$  e de  $\text{TNF-}\alpha$ , da diminuição nos níveis de  $\text{IL-10}$ , protegendo também do aumento na permeabilidade da BHE, e do aumento na atividade da enzima MPO, vinte e quatro horas após o TCE. Relatos anteriores demonstram que o exercício pode, de fato, modular a respostas inflamatórias (PETERSEN; PEDERSEN,



2005; WOODS, 2005), uma vez que, reduz o processo inflamatório, os níveis de quimiocina e citocinas pró-inflamatórias, mas também estimula uma resposta imune alternativa, importante para limitar os efeitos neurotóxicos de inflamação (PIAO et al., 2013).

Neste contexto, tem-se demonstrado também que o exercício de pré-condicionamento inibe o acúmulo de citocinas pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), protege do aumento na migração de neutrófilos e aumenta os níveis de citocinas antiinflamatórias (IL-10), (KNOBLACH; FADEN, 1998; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Estas modificações desencadeadas pelo exercício físico, são acompanhadas por uma proteção no comprometimento motor destes animais, reforçando a ideia de que o exercício físico altera funções neurológicas e, diminui as cascatas secundárias que levam, tardiamente, a danos celulares e déficit comportamental após o TCE (STAHSEL et al., 2000).

Outro achado do nosso estudo demonstrou que o exercício físico prévio foi capaz de proteger da diminuição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, o que já havia sido descrito pelo nosso grupo (LIMA et al., 2009). Neste sentido, esta proteção sugere que as respostas adaptativas a prática regular de exercícios de intensidade moderada, protegem contra a falência de alguns alvos seletivos, tais como a enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase neste modelo de TCE. Ainda, observamos uma correlação negativa entre o aumento na atividade da enzima MPO e a inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nos animais treinados após a LPF, reforçando esta ideia e sugerindo que o exercício físico prévio protege da infiltração de neutrófilos induzida pelo TCE e, subsequente, da inibição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

Resumindo, os resultados apresentados neste estudo revelaram que as modificações no perfil inflamatório cerebral após o TCE estão relacionadas na inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Além disso, o exercício exerceu efeito profilático neste modelo de LPF, aumentando a liberação de mediadores antiinflamatórios (IL-10), reduzindo a infiltração de neutrófilos (MPO), protegendo da abertura da BHE, diminuindo o acúmulo de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e atenuando o comprometimento neuromotor. Portanto, estas alterações no perfil neuroinflamatório provocada pelo treinamento aeróbio prévio (WOODS, 2005) podem estar reduzindo os danos iniciais, limitando a cascata do dano

secundário, e assim em longo prazo, protegendo da degeneração após o TCE (LENZLINGER et al., 2004; SHLOSBERG et al., 2010).

---

---

**CONCLUSÕES**

## **4. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

**a)** O exercício físico prévio protegeu do aumento nos níveis de marcadores de inflamação aguda, protegendo da elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e prevenindo da diminuição nos níveis de IL-10, vinte e quatro horas após este modelo de TCE.

**b)** Nosso protocolo de exercício físico também foi eficiente protegendo do aumento na abertura e permeabilidade da BHE e protegendo também do aumento na atividade da enzima MPO vinte e quatro horas após o TCE, evidenciando desta forma uma proteção do exercício no aumento exacerbado da migração e infiltração de neutrófilos, vinte e quatro horas após a LPF.

**c)** As quatro semanas de exercício prévio preveniram a inibição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, vinte e quatro horas após este modelo de TCE, mostrando também haver uma correlação negativa entre o aumento da atividade da enzima MPO e a inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em ratos treinados e submetidos à LPF.

**d)** O exercício físico também mostrou importante proteção no déficit motor induzido vinte e quatro horas após o TCE, protegendo da diminuição nos escores dos testes comportamentais de neuroscore nos animais treinados e submetidos à LPF.

---

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **J Anat**, v. 200, n. 6, p. 629-638, 2002.

ABDEL BAKI, S. G.; SCHWAB, B.; HABER, M.; FENTON, A. A.; BERGOLD, P. J. Minocycline synergizes with N-acetylcysteine and improves cognition and memory following traumatic brain injury in rats. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12490, 2010.

AIGUO, W.; ZHE, Y.; GOMEZ-PINILLA, F. Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 24, n. 3, p. 290-298, 2010.

ALEXANDER, M. P. Mild traumatic brain injury: pathophysiology, natural history, and clinical management. **Neurology**, v. 45, n. 7, p. 1253-1260, 1995.

ANG, E. T.; WONG, P. T.; MOOCHHALA, S.; NG, Y. K. Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 337-347, 2004.

ANG, E. T.; DAWE, G. S.; WONG, P. T.; MOOCHHALA, S.; NG, Y. K. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. **Brain Res**, v. 1113, n. 1, p. 186-193, 2006.

ANG, E. T.; GOMEZ-PINILLA, F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 24, p. 2564-2571, 2007.

ANNEGERS, J. F.; GRABOW, J. D.; GROOVER, R. V.; LAWS, E. R., JR.; ELVEBACK, L. R.; KURLAND, L. T. Seizures after head trauma: a population study. **Neurology**, v. 30, n. 7 Pt 1, p. 683-689, 1980.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; DOS SANTOS, N. F.; PERES, C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v. 37, n. 1, p. 45-52, 1999.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; TERRA, V. C.; CYSNEIROS, R. M.; CAVALHEIRO, E. A. Physical exercise in rats with epilepsy is protective against seizures: evidence of animal studies. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67, n. 4, p. 1013-1016, 2009.

ASANUMA, H.; PAVLIDES, C. Neurobiological basis of motor learning in mammals. **Neuroreport**, v. 8, n. 4, p. i-vi, 1997.

ATKINS, C. M.; FALO, M. C.; ALONSO, O. F.; BRAMLETT, H. M.; DIETRICH, W. D. Deficits in ERK and CREB activation in the hippocampus after traumatic brain injury. **Neurosci Lett**, v. 459, n. 2, p. 52-56, 2009.

BAKER, A. J.; PARK, E.; HARE, G. M.; LIU, E.; SIKICH, N.; MAZER, D. C. Effects of resuscitation fluid on neurologic physiology after cerebral trauma and hemorrhage. **J Trauma**, v. 64, n. 2, p. 348-357, 2008.

BENEDETTI, M. G.; GASPARRONI, V.; STECCHI, S.; ZILIOLI, R.; STRAUDI, S.; PIPERNO, R. Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 45, n. 1, p. 53-59, 2009.

BLUMBERGS, P. C.; SCOTT, G.; MANAVIS, J.; WAINWRIGHT, H.; SIMPSON, D. A.; MCLEAN, A. J. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 4, p. 565-572, 1995.

BOOTH, M. L.; OKELY, A. D.; CHEY, T.; BAUMAN, A. E.; MACASKILL, P. Epidemiology of physical activity participation among New South Wales school students. **Aust N Z J Public Health**, v. 26, n. 4, p. 371-374, 2002.

BRAMLETT, H. M.; DIETRICH, W. D. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 24, n. 2, p. 133-150, 2004.

BREAKSPEAR, M.; TERRY, J. R.; FRISTON, K. J. Modulation of excitatory synaptic coupling facilitates synchronization and complex dynamics in a biophysical model of neuronal dynamics. **Network**, v. 14, n. 4, p. 703-732, 2003.

BROSSE, A. L.; SHEETS, E. S.; LETT, H. S.; BLUMENTHAL, J. A. Exercise and the treatment of clinical depression in adults: recent findings and future directions. **Sports Med**, v. 32, n. 12, p. 741-760, 2002.

BULLOCK, R.; ZAUNER, A.; WOODWARD, J. J.; MYSEROS, J.; CHOI, S. C.; WARD, J. D.; MARMAROU, A.; YOUNG, H. F. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. **J Neurosurg**, v. 89, n. 4, p. 507-518, 1998.

BYE, N.; TURNLEY, A. M.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C. Inflammatory regulators of redirected neural migration in the injured brain. **Neurosignals**, v. 20, n. 3, p. 132-146, 2012.

CALLAGHAN, P. Exercise: a neglected intervention in mental health care? **J Psychiatr Ment Health Nurs**, v. 11, n. 4, p. 476-483, 2004.

CERNAK, I.; O'CONNOR, C.; VINK, R. Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. **Exp Brain Res**, v. 147, n. 2, p. 193-199, 2002.

CHODOBSKI, A.; ZINK, B. J.; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. **Transl Stroke Res**, v. 2, n. 4, p. 492-516, 2011.

CHOW, J. W.; YABLON, S. A.; HORN, T. S.; STOKIC, D. S. Temporospacial characteristics of gait in patients with lower limb muscle hypertonia after traumatic brain injury. **Brain Inj**, v. 24, n. 13-14, p. 1575-1584, 2010.

COLCOMBE, S. J.; KRAMER, A. F.; MCAULEY, E.; ERICKSON, K. I.; SCALF, P. Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions. **J Mol Neurosci**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2004.

CORONADO, V. G.; XU, L.; BASAVARAJU, S. V.; MCGUIRE, L. C.; WALD, M. M.; FAUL, M. D.; GUZMAN, B. R.; HEMPHILL, J. D. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. **MMWR Surveill Summ**, v. 60, n. 5, p. 1-32, 2011.

CORONADO, V. G.; MCGUIRE, L. C.; SARMIENTO, K.; BELL, J.; LIONBARGER, M. R.; JONES, C. D.; GELLER, A. I.; KHOURY, N.; XU, L. Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995-2009. **J Safety Res**, v. 43, n. 4, p. 299-307, 2012.

CORSO, P.; FINKELSTEIN, E.; MILLER, T.; FIEBELKORN, I.; ZALOSHNIJA, E. Incidence and lifetime costs of injuries in the United States. **Inj Prev**, v. 12, n. 4, p. 212-218, 2006.



COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-695, 1993.

CRESPO, I.; GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; ALMAR, M.; GONZALEZ, P.; TUNON, M. J.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 5, p. 1555-1569, 2008.

D'HEMECOURT, P. Subacute symptoms of sports-related concussion: outpatient management and return to play. **Clin Sports Med**, v. 30, n. 1, p. 63-72, viii, 2011.

DAS, M.; MOHAPATRA, S.; MOHAPATRA, S. S. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. **J Neuroinflammation**, v. 9, n., p. 236, 2012.

DE OLIVEIRA THAIS, M. E.; CAVALLAZZI, G.; FORMOLO, D. A.; DE CASTRO, L. D.; SCHMOELLER, R.; GUARNIERI, R.; SCHWARZBOLD, M. L.; DIAZ, A. P.; HOHL, A.; PREDIGER, R. D.; MADER, M. J.; LINHARES, M. N.; STANILOIU, A.; MARKOWITSCH, H. J.; WALZ, R. Limited predictive power of hospitalization variables for long-term cognitive prognosis in adult patients with severe traumatic brain injury. **J Neuropsychol**, v., n., p., 2012.

DIETRICH, M. O.; ANDREWS, Z. B.; HORVATH, T. L. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10766-10771, 2008.

DIKMEN, S.; MACHAMER, J.; MILLER, B.; DOCTOR, J.; TEMKIN, N. Functional status examination: a new instrument for assessing outcome in traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 2, p. 127-140, 2001.

DING, Y. H.; DING, Y.; LI, J.; BESSERT, D. A.; RAFOLS, J. A. Exercise preconditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. **Neurol Res**, v. 28, n. 2, p. 184-189, 2006.

DUGAN, L. L.; SENSI, S. L.; CANZONIERO, L. M.; HANDRAN, S. D.; ROTHMAN, S. M.; LIN, T. S.; GOLDBERG, M. P.; CHOI, D. W. Mitochondrial

production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6377-6388, 1995.

ENDRES, M.; GERTZ, K.; LINDAUER, U.; KATCHANOV, J.; SCHULTZE, J.; SCHROCK, H.; NICKENIG, G.; KUSCHINSKY, W.; DIRNAGL, U.; LAUFS, U. Mechanisms of stroke protection by physical activity. **Ann Neurol**, v. 54, n. 5, p. 582-590, 2003.

FAUL, M.; WALD, M. M.; RUTLAND-BROWN, W.; SULLIVENT, E. E.; SATTIN, R. W. Using a cost-benefit analysis to estimate outcomes of a clinical treatment guideline: testing the Brain Trauma Foundation guidelines for the treatment of severe traumatic brain injury. **J Trauma**, v. 63, n. 6, p. 1271-1278, 2007.

FAUL, M., et al. 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.

FINFER, S. R.; COHEN, J. Severe traumatic brain injury. **Resuscitation**, v. 48, n. 1, p. 77-90, 2001.

FORDYCE, D. E.; STARNES, J. W.; FARRAR, R. P. Compensation of the age-related decline in hippocampal muscarinic receptor density through daily exercise or underfeeding. **J Gerontol**, v. 46, n. 6, p. B245-248, 1991.

FRATIGLIONI, L.; PAILLARD-BORG, S.; WINBLAD, B. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 6, p. 343-353, 2004.

FREY, L. C. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 10, n., p. 11-17, 2003.

FUJIMOTO, S. T.; LONGHI, L.; SAATMAN, K. E.; CONTE, V.; STOCCHETTI, N.; MCINTOSH, T. K. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-378, 2004.

GENNARELLI, T. A. The spectrum of traumatic axonal injury. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 22, n. 6, p. 509-513, 1996.

GENNARELLI, T. A.; GRAHAM, D. I. Neuropathology of the Head Injuries. **Semin Clin Neuropsychiatry**, v. 3, n. 3, p. 160-175, 1998.

GENTRY, L. R. Imaging of closed head injury. **Radiology**, v. 191, n. 1, p. 1-17, 1994.

GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L.; ENG, L. F. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. **Neurochem Res**, v. 23, n. 3, p. 329-340, 1998.

GLOBUS, M. Y.; ALONSO, O.; DIETRICH, W. D.; BUSTO, R.; GINSBERG, M. D. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. **J Neurochem**, v. 65, n. 4, p. 1704-1711, 1995.

GOPCEVIC, A.; MAZUL-SUNKO, B.; MAROUT, J.; SEKULIC, A.; ANTOLJAK, N.; SIRANOVIC, M.; IVANEC, Z.; MARGARITONI, M.; BEKAVAC-BESLIN, M.; ZARKOVIC, N. Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury. **Tohoku J Exp Med**, v. 211, n. 4, p. 387-393, 2007.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. **FEBS Lett**, v. 585, n. 23, p. 3798-3805, 2011.

GRAHAM, D. I.; ADAMS, J. H.; NICOLL, J. A.; MAXWELL, W. L.; GENNARELLI, T. A. The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. **Brain Pathol**, v. 5, n. 4, p. 397-406, 1995.

GREFKES, C.; NOWAK, D. A.; EICKHOFF, S. B.; DAFOTAKIS, M.; KUST, J.; KARBE, H.; FINK, G. R. Cortical connectivity after subcortical stroke assessed with functional magnetic resonance imaging. **Ann Neurol**, v. 63, n. 2, p. 236-246, 2008.

GREVE, M. W.; ZINK, B. J. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Mt Sinai J Med**, v. 76, n. 2, p. 97-104, 2009.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; MOLTENI, R.; WU, A.; GOMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 129-139, 2004.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; SUTTON, R. L. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 530-540, 2008.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res**, v. 1288, n., p. 105-115, 2009.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 141-149, 1992.

GUO, M.; COX, B.; MAHALE, S.; DAVIS, W.; CARRANZA, A.; HAYES, K.; SPRAGUE, S.; JIMENEZ, D.; DING, Y. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke. **Neuroscience**, v. 151, n. 2, p. 340-351, 2008.

GUO, Z. H.; MATTSON, M. P. Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function. **Cereb Cortex**, v. 10, n. 1, p. 50-57, 2000.

HAMMACHER, A.; WARD, L. D.; WEINSTOCK, J.; TREUTLEIN, H.; YASUKAWA, K.; SIMPSON, R. J. Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. **Protein Sci**, v. 3, n. 12, p. 2280-2293, 1994.

HANDLEY, A.; MEDCALF, P.; HELLIER, K.; DUTTA, D. Movement disorders after stroke. **Age Ageing**, v. 38, n. 3, p. 260-266, 2009.

HAUSMANN, M.; ROGLER, G. Immune-non immune networks in intestinal inflammation. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 5, p. 388-394, 2008.

HAYES, R. L.; DIXON, C. E. Neurochemical changes in mild head injury. **Semin Neurol**, v. 14, n. 1, p. 25-31, 1994.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 58-65, 2008.

HOSP, J. A.; LUFT, A. R. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. **Neural Plast**, v. 2011, n., p. 871296, 2011.

HUMMEL, F.; COHEN, L. G. Improvement of motor function with noninvasive cortical stimulation in a patient with chronic stroke. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, n. 1, p. 14-19, 2005.

ITOH, T.; IMANO, M.; NISHIDA, S.; TSUBAKI, M.; HASHIMOTO, S.; ITO, A.; SATOU, T. Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. **J Neural Transm**, v. 118, n. 9, p. 1263-1272, 2011a.

ITOH, T.; IMANO, M.; NISHIDA, S.; TSUBAKI, M.; HASHIMOTO, S.; ITO, A.; SATOU, T. Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. **J Neural Transm**, v. 118, n. 2, p. 193-202, 2011b.

IVASHKOVA, Y.; SVETNITSKY, A.; MAYZLER, O.; PRUNEAU, D.; BENIFLA, M.; FUXMAN, Y.; COHEN, A.; ARTRU, A. A.; SHAPIRA, Y. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. **J Trauma**, v. 61, n. 4, p. 879-885, 2006.

JAMME, I.; PETIT, E.; DIVOUX, D.; GERBI, A.; MAIXENT, J. M.; NOUVELOT, A. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-337, 1995.

JONES, T. A.; CHU, C. J.; GRANDE, L. A.; GREGORY, A. D. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. **J Neurosci**, v. 19, n. 22, p. 10153-10163, 1999.

JULIET, P. A.; MAO, X.; DEL BIGLIO, M. R. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. **Brain Res**, v. 1210, n., p. 230-239, 2008.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu Rev Biochem**, v. 71, n., p. 511-535, 2002.

KIM, J. Y.; PARK, J. H. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. **FEBS Lett**, v. 549, n. 1-3, p. 94-98, 2003.

KLUMPP, S.; LIPOWSKY, R. Active diffusion of motor particles. **Phys Rev Lett**, v. 95, n. 26, p. 268102, 2005.

KNOBLACH, S. M.; FADEN, A. I. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 153, n. 1, p. 143-151, 1998.

KOHL, Z.; KANDASAMY, M.; WINNER, B.; AIGNER, R.; GROSS, C.; COUILLARD-DESPRES, S.; BOGDAHN, U.; AIGNER, L.; WINKLER, J. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, v. 1155, n., p. 24-33, 2007.

KRAMER, A. F.; HAHN, S.; COHEN, N. J.; BANICH, M. T.; MCAULEY, E.; HARRISON, C. R.; CHASON, J.; VAKIL, E.; BARDELL, L.; BOILEAU, R. A.; COLCOMBE, A. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-419, 1999.

LARSON, E. B.; WANG, L.; BOWEN, J. D.; MCCORMICK, W. C.; TERI, L.; CRANE, P.; KUKULL, W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 2, p. 73-81, 2006.

LAURIN, D.; VERREAULT, R.; LINDSAY, J.; MACPHERSON, K.; ROCKWOOD, K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, v. 58, n. 3, p. 498-504, 2001.

LEEDS, P.; LENG, Y.; CHALECKA-FRANASZEK, E.; CHUANG, D. M. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. **Neurochem Int**, v. 46, n. 1, p. 61-72, 2005.

LENZ, A.; FRANKLIN, G. A.; CHEADLE, W. G. Systemic inflammation after trauma. **Injury**, v. 38, n. 12, p. 1336-1345, 2007.

LENZLINGER, P. M.; SAATMAN, K. E.; HOOVER, R. C.; CHENEY, J. A.; BAREYRE, F. M.; RAGHUPATHI, R.; ARNOLD, L. D.; MCINTOSH, T. K. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 73-79, 2004.

LIAN, H.; SHIM, D. J.; GADDAM, S. S.; RODRIGUEZ-RIVERA, J.; BITNER, B. R.; PAUTLER, R. G.; ROBERTSON, C. S.; ZHENG, H. IkappaBalpha deficiency in brain leads to elevated basal neuroinflammation and attenuated response following traumatic brain injury: implications for functional recovery. **Mol Neurodegener**, v. 7, n., p. 47, 2012.

LIMA, F. D.; SOUZA, M. A.; FURIAN, A. F.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; MARTIGNONI, F. V.; HOFFMANN, M. S.; FIGHERA, M. R.; ROYES, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; DE MELLO, C. F. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. **Behav Brain Res**, v. 193, n. 2, p. 306-310, 2008.

LIMA, F. D.; OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; SOUZA, M. A.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; SILVA, L. F.; RETAMOSO, L. T.; HOFFMANN, M. S.; MAGNI, D. V.; PEREIRA, L.; FIGHERA, M. R.; MELLO, C. F.; ROYES, L. F. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 1279, n., p. 147-155, 2009.

LIPTON, S. A.; BOSSY-WETZEL, E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. **Cell**, v. 111, n. 2, p. 147-150, 2002.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, n., p. S232-240, 2006.

MAAS, A. I.; STOCCHETTI, N.; BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 8, p. 728-741, 2008.

MAAS, A. I.; ROOZENBEEK, B.; MANLEY, G. T. Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 115-126, 2010.

MARKLUND, N.; MORALES, D.; CLAUSEN, F.; HANELL, A.; KIWANUKA, O.; PITKANEN, A.; GIMBEL, D. A.; PHILIPSON, O.; LANNFELT, L.; HILLERED, L.; STRITTMATTER, S. M.; MCINTOSH, T. K. Functional outcome is impaired following traumatic brain injury in aging Nogo-A/B-deficient mice. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 540-551, 2009.

MAX, W.; RICE, D. P.; MACKENZIE, E. J. The lifetime cost of injury. **Inquiry**, v. 27, n. 4, p. 332-343, 1990.

MAXWELL, W. L.; DHILLON, K.; HARPER, L.; ESPIN, J.; MACINTOSH, T. K.; SMITH, D. H.; GRAHAM, D. I. There is differential loss of pyramidal cells from the human hippocampus with survival after blunt head injury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 3, p. 272-279, 2003.

MCAULEY, E.; KRAMER, A. F.; COLCOMBE, S. J. Cardiovascular fitness and neurocognitive function in older adults: a brief review. **Brain Behav Immun**, v. 18, n. 3, p. 214-220, 2004.

MCINTOSH, T. K.; JUHLER, M.; WIELOCH, T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: 1998. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 10, p. 731-769, 1998.



MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, n. 2, p. 185-194, 1995.

MOREAU, M. E.; DUBREUIL, P.; MOLINARO, G.; CHAGNON, M.; MULLER-ESTERL, W.; LEPAGE, Y.; MARCEAU, F.; ADAM, A. Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 315, n. 3, p. 1065-1074, 2005.

MORRIS, R. G. Long-term potentiation and memory. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1432, p. 643-647, 2003.

MOSELEY, A. E.; WILLIAMS, M. T.; SCHAEFER, T. L.; BOHANAN, C. S.; NEUMANN, J. C.; BEHBEHANI, M. M.; VORHEES, C. V.; LINGREL, J. B. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

MURASE, N.; DUQUE, J.; MAZZOCCHIO, R.; COHEN, L. G. Influence of interhemispheric interactions on motor function in chronic stroke. **Ann Neurol**, v. 55, n. 3, p. 400-409, 2004.

MUSSACK, T.; BIBERTHALER, P.; GEISENBERGER, T.; GIPPNER-STEPPERT, C.; STECKMEIER, B.; MUTSCHLER, W.; JOCHUM, M. Assessment of early brain damage in carotid endarterectomy: evaluation of S-100B serum levels and somatosensory evoked potentials in a pilot study. **World J Surg**, v. 26, n. 10, p. 1251-1255, 2002.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 109, 1995.

NEUWELT, E.; ABBOTT, N. J.; ABREY, L.; BANKS, W. A.; BLAKLEY, B.; DAVIS, T.; ENGELHARDT, B.; GRAMMAS, P.; NEDERGAARD, M.; NUTT, J.; PARDRIDGE, W.; ROSENBERG, G. A.; SMITH, Q.; DREWES, L. R. Strategies to advance translational research into brain barriers. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 1, p. 84-96, 2008.

NIMMO, A. J.; CERNAK, I.; HEATH, D. L.; HU, X.; BENNETT, C. J.; VINK, R. Neurogenic inflammation is associated with development of edema and functional deficits following traumatic brain injury in rats. **Neuropeptides**, v. 38, n. 1, p. 40-47, 2004.

NORTJE, J.; MENON, D. K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Curr Opin Neurol**, v. 17, n. 6, p. 711-718, 2004.



OKONKWO, D. O.; POVLISHOCK, J. T. An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 4, p. 443-451, 1999.

OLIVEIRA, R. A.; ARAUJO, S.; FALCAO, A. L.; SOARES, S. M.; KOSOUR, C.; DRAGOSAVAC, D.; CINTRA, E. A.; CARDOSO, A. P.; THIESEN, R. A. Glasgow outcome scale at hospital discharge as a prognostic index in patients with severe traumatic brain injury. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 8, p. 604-608, 2012.

PALMER, A. M.; MARION, D. W.; BOTSCHELLER, M. L.; SWEDLOW, P. E.; STYREN, S. D.; DEKOSKY, S. T. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. **J Neurochem**, v. 61, n. 6, p. 2015-2024, 1993.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, 2005.

PETRUSHANKO, I.; BOGDANOV, N.; BULYGINA, E.; GRENACHER, B.; LEINSOO, T.; BOLDYREV, A.; GASSMANN, M.; BOGDANOVA, A. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 4, p. R916-925, 2006.

PETRUSHANKO, I. Y.; BOGDANOV, N. B.; LAPINA, N.; BOLDYREV, A. A.; GASSMANN, M.; BOGDANOVA, A. Y. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. **J Gen Physiol**, v. 130, n. 4, p. 389-398, 2007.

PETTUS, E. H.; CHRISTMAN, C. W.; GIEBEL, M. L.; POVLISHOCK, J. T. Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 5, p. 507-522, 1994.

PIAO, C. S.; STOICA, B. A.; WU, J.; SABIRZHANOV, B.; ZHAO, Z.; CABATBAT, R.; LOANE, D. J.; FADEN, A. I. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. **Neurobiol Dis**, v., n., p., 2013.

PINEDA, J. A.; LEWIS, S. B.; VALADKA, A. B.; PAPA, L.; HANNAY, H. J.; HEATON, S. C.; DEMERY, J. A.; LIU, M. C.; AIKMAN, J. M.; AKLE, V.; BROPHY, G. M.; TEPAS, J. J.; WANG, K. K.; ROBERTSON, C. S.; HAYES, R. L. Clinical significance of alphaII-spectrin breakdown products in cerebrospinal

fluid after severe traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 24, n. 2, p. 354-366, 2007.

PITKANEN, A.; MCINTOSH, T. K. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 241-261, 2006.

POTTS, M. B.; KOH, S. E.; WHETSTONE, W. D.; WALKER, B. A.; YONEYAMA, T.; CLAUS, C. P.; MANVELYAN, H. M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. **NeuroRx**, v. 3, n. 2, p. 143-153, 2006.

POWELL, K. E.; PAFFENBARGER, R. S., JR. Workshop on Epidemiologic and Public Health Aspects of Physical Activity and Exercise: a summary. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 118-126, 1985.

PUN, P. B.; LU, J.; MOOCHHALA, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. **Free Radic Res**, v. 43, n. 4, p. 348-364, 2009.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem Int**, v. 38, n. 1, p. 17-23, 2001.

RAY, S. K.; DIXON, C. E.; BANIK, N. L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. **Histol Histopathol**, v. 17, n. 4, p. 1137-1152, 2002.

REILLY, P. L.; GRAHAM, D. I.; ADAMS, J. H.; JENNETT, B. Patients with head injury who talk and die. **Lancet**, v. 2, n. 7931, p. 375-377, 1975.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 1, p. 13-19, 2003.

ROBERTSON, C. L.; BELL, M. J.; KOCHANNEK, P. M.; ADELSON, P. D.; RUPPEL, R. A.; CARCILLO, J. A.; WISNIEWSKI, S. R.; MI, Z.; JANESKO, K. L.; CLARK, R. S.; MARION, D. W.; GRAHAM, S. H.; JACKSON, E. K. Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: association with severity of injury and excitotoxicity. **Crit Care Med**, v. 29, n. 12, p. 2287-2293, 2001.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev Pathol**, v. 3, n., p. 99-126, 2008.

RUFF, R. M.; CAMENZULI, L.; MUELLER, J. Miserable minority: emotional risk factors that influence the outcome of a mild traumatic brain injury. **Brain Inj**, v. 10, n. 8, p. 551-565, 1996.

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

SALMON, P. Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. **Clin Psychol Rev**, v. 21, n. 1, p. 33-61, 2001.

SAMORAJSKI, T.; DELANEY, C.; DURHAM, L.; ORDY, J. M.; JOHNSON, J. A.; DUNLAP, W. P. Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice. **Neurobiol Aging**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 1985.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med (Berl)**, v. 78, n. 1, p. 3-13, 2000.

SEO, T. B.; KIM, B. K.; KO, I. G.; KIM, D. H.; SHIN, M. S.; KIM, C. J.; YOON, J. H.; KIM, H. Effect of treadmill exercise on Purkinje cell loss and astrocytic reaction in the cerebellum after traumatic brain injury. **Neurosci Lett**, v. 481, n. 3, p. 178-182, 2010.

SHERIFF, F. E.; BRIDGES, L. R.; SIVALOGANATHAN, S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for  $\beta$ -amyloid precursor protein. **Acta Neuropathology**, v. 87, n., p. 55-62, 1994.

SHLOSBERG, D.; BENIFLA, M.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 7, p. 393-403, 2010.

SHOHAMI, E.; GINIS, I.; HALLENBECK, J. M. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 10, n. 2, p. 119-130, 1999.

SHUKLA, D.; DEVI, B. I.; AGRAWAL, A. Outcome measures for traumatic brain injury. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 113, n. 6, p. 435-441, 2011.

SILVER, J. M.; MCALLISTER, T. W.; YUDOFKY, S. D. **Test Book of Traumatic Brain Injury**. London, England: APPI Press, 2005

SINGLETON, R. H.; YAN, H. Q.; FELLOWS-MAYLE, W.; DIXON, C. E. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 6, p. 1091-1099, 2010.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr**, v. 24, n. 3, p. 249-261, 1992.

SMITH, D. H.; WOLF, J. A.; LUSARDI, T. A.; LEE, V. M.; MEANEY, D. F. High tolerance and delayed elastic response of cultured axons to dynamic stretch injury. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. 4263-4269, 1999.

SMITH, S. L.; ANDRUS, P. K.; ZHANG, J. R.; HALL, E. D. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 4, p. 393-404, 1994.

ST-PIERRE, D. H.; FARAJ, M.; KARELIS, A. D.; CONUS, F.; HENRY, J. F.; ST-ONGE, M.; TREMBLAY-LEBEAU, A.; CIANFLONE, K.; RABASA-LHORET, R. Lifestyle behaviours and components of energy balance as independent predictors of ghrelin and adiponectin in young non-obese women. **Diabetes Metab**, v. 32, n. 2, p. 131-139, 2006.

STAHEL, P. F.; SHOHAMI, E.; YOUNIS, F. M.; KARIYA, K.; OTTO, V. I.; LENZLINGER, P. M.; GROSJEAN, M. B.; EUGSTER, H. P.; TRENTZ, O.; KOSSMANN, T.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 20, n. 2, p. 369-380, 2000.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol**, v. 44, n., p. 681-693, 1986.

STEENSBERG, A. The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. **Exerc Immunol Rev**, v. 9, n., p. 40-47, 2003.

STEINER, S. R.; PHILBERT, M. A. Proteomic identification of carbonylated proteins in 1,3-dinitrobenzene neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 362-373, 2011.

STIVER, S. I.; MANLEY, G. T. Prehospital management of traumatic brain injury. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 4, p. E5, 2008.

STONE, J. R.; SINGLETON, R. H.; POVLISHOCK, J. T. Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. **Brain Res**, v. 871, n. 2, p. 288-302, 2000.

STREIT, W. J.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **J Neuroinflammation**, v. 1, n. 1, p. 14, 2004.

SULLIVAN, P. G.; RABCHEVSKY, A. G.; WALDMEIER, P. C.; SPRINGER, J. E. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 231-239, 2005.

TAKEUCHI, A.; REYES, N.; ARTIGAS, P.; GADSBY, D. C. The ion pathway through the opened Na(+),K(+)-ATPase pump. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 413-416, 2008.

TAUPIN, V.; GOGUSEV, J.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; ZAVALA, F. Modulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide: evidence for a role of prostaglandins. **Mol Pharmacol**, v. 43, n. 1, p. 64-69, 1993.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-84, 1974.

TEHRANIAN, R.; ANDELL-JONSSON, S.; BENI, S. M.; YATSIV, I.; SHOHAMI, E.; BARTFAI, T.; LUNDKVIST, J.; IVERFELDT, K. Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. **J Neurotrauma**, v. 19, n. 8, p. 939-951, 2002.

TILG, H.; TREHU, E.; ATKINS, M. B.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 113-118, 1994.

TILLERSON, J. L.; CAUDLE, W. M.; REVERON, M. E.; MILLER, G. W. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

TOYOSHIMA, C.; KANAI, R.; CORNELIUS, F. First crystal structures of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: new light on the oldest ion pump. **Structure**, v. 19, n. 12, p. 1732-1738, 2011.

TSIOTOU, A. G.; SAKORAFAS, G. H.; ANAGNOSTOPOULOS, G.; BRAMIS, J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. **Med Sci Monit**, v. 11, n. 3, p. RA76-85, 2005.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 283-290, 2009.

VAN WAGONER, N. J.; BENVENISTE, E. N. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. **J Neuroimmunol**, v. 100, n. 1-2, p. 124-139, 1999.

VENTURI, L.; MIRANDA, M.; SELMI, V.; VITALI, L.; TANI, A.; MARGHERI, M.; DE GAUDIO, A. R.; ADEMBRI, C. Systemic sepsis exacerbates mild post-traumatic brain injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 9, p. 1547-1556, 2009.

VERWEIJ, B. H.; MUIZELAAR, J. P.; VINAS, F. C.; PETERSON, P. L.; XIONG, Y.; LEE, C. P. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. **J Neurosurg**, v. 93, n. 5, p. 815-820, 2000.

VINK, R.; YOUNG, A.; BENNETT, C. J.; HU, X.; CONNOR, C. O.; CERNAK, I.; NIMMO, A. J. Neuropeptide release influences brain edema formation after diffuse traumatic brain injury. **Acta Neurochir Suppl**, v. 86, n., p. 257-260, 2003.

WANG, L.; YU, C.; CHEN, H.; QIN, W.; HE, Y.; FAN, F.; ZHANG, Y.; WANG, M.; LI, K.; ZANG, Y.; WOODWARD, T. S.; ZHU, C. Dynamic functional reorganization of the motor execution network after stroke. **Brain**, v. 133, n. Pt 4, p. 1224-1238, 2010.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth**, v. 99, n. 1, p. 4-9, 2007.

WILSON, D.; ZAQOUT, M.; HEO, J. H.; PARK, E. K.; OAK, C. H.; UENO, S. Nuclear factor-kappa B is not involved in titanium dioxide-induced inflammation. **J UOEH**, v. 34, n. 2, p. 183-191, 2012.

WOODS, J. A. Physical activity, exercise, and immune function. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 5, p. 369-370, 2005.

XERRI, C.; COQ, J. O.; MERZENICH, M. M.; JENKINS, W. M. Experience-induced plasticity of cutaneous maps in the primary somatosensory cortex of adult monkeys and rats. **J Physiol Paris**, v. 90, n. 3-4, p. 277-287, 1996.

ZITNAY, G. A. Lessons from national and international TBI societies and funds like NBIRTT. **Acta Neurochir Suppl**, v. 93, n., p. 131-133, 2005.