

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

**PAPEL DO RECEPTOR B₂ DAS CININAS E DA
NADPH-OXIDASE NO DANO SECUNDÁRIO
ASSOCIADO AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS**

TESE DE DOUTORADO

Ana Paula de Oliveira Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil
2013

PPGBOX/UFSM,RS

FERREIRA, Ana Paula de Oliveira

Doutor

2013

**PAPEL DO RECEPTOR B₂ DAS CININAS E DA NADPH-
OXIDASE NO DANO SECUNDÁRIO E DÉFICIT COGNITIVO
ASSOCIADO AO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO
EM CAMUNDONGOS**

Ana Paula de Oliveira Ferreira

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Oliveira Ferreira, Ana Paula
PAPEL DO RECEPTOR B2 DAS CININAS E DA NADPH-OXIDASE
NO DANO SECUNDÁRIO ASSOCIADO AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS / Ana Paula de Oliveira
Ferreira.-2013.
150 p.; 30cm

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes
Coorientadores: Juliano Ferreira, Michele Rechia
Fighera
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2013

1. Traumatismo Cranioencefálico 2. Bradicinina 3.
NADPH-oxidase 4. Inflamação 5. Memória I. Freire Royes,
Luiz Fernando II. Ferreira, Juliano III. Rechia
Fighera, Michele IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

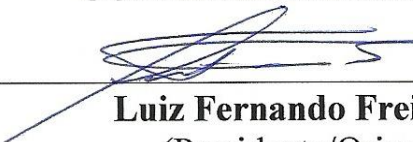
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado.

**PAPEL DO RECEPTOR B₂ DAS CININAS E DA NADPH-OXIDASE NO
DANO SECUNDÁRIO ASSOCIADO AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO**


elaborada por
Ana Paula de Oliveira Ferreira

como requisito para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica


COMISSÃO EXAMINADORA



Luiz Fernando Freire Royes
(Presidente/Orientador)



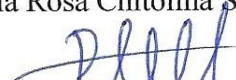
Cristiano Ricardo Jesse (UNIPAMPA)



Cristina Wayne Nogueira (UFSM)



Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)



Rafael Noal Moresco (UFSM)

Santa Maria, 22 de novembro 2013.

Esta tese é dedicada aos meus pais e irmãos e ao meu namorado que sempre deram o suporte necessário às minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre abriu os meus caminhos, iluminou meus passos e me encheu de força e coragem para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo, carinho, amor, conselhos, pela paciência e compreensão que os fez entender as minhas muitas ausências nestes quatro anos. Vocês são os alicerces da minha vida!

Ao meu namorado, que ouviu todas as minhas angústias e apoiou todos os meus passos nestes quatro anos, mesmo tendo que ficar sem namorada por muitas vezes.

“More”, te amo muito!

Aos meus orientadores e amigos, Professor Dr. Luiz Fernando Freire Royes e Professor Dra. Michele Fighera, por acolher-me, acreditar em mim, pela atenção, pelo carinho, pela disponibilidade e auxílio intelectual.

Faço também um agradecimento ao Professor Juliano Ferreira pela disponibilidade e auxílio intelectual.

Aos INESQUECÍVEIS amigos do grupo do BioEx, cuja amizade e o companheirismo criaram um lugar onde se pode dizer: SOMOS TODOS IRMÃOS.

Iuri, Rogério, André, Fred, Fernando, Xará, Maurício, Lelê, Léo, Busanelo, Breshiani, Maurão, Maurinho, Luis, pela convivência maravilhosa. Ao Samurai que dividiu comigo sua Bolsa de Pos-Doc, mesmo eu dizendo que não era preciso. As meninas da “Ceita” Mauren, Fernanda e Bibiana amigonas do peito que estavam sempre junto comigo na alegria e na tristeza. As “paquitas” Fernanda “tiopental”, Alexandra e Marla pela amizade e ajuda.

ADORO TODOS!

Agradeço ainda à Dona Idalina pela simpatia, cordialidade e essencial serviço prestado.

E finalmente à CAPES pela bolsa concedida, que muito me auxiliou durante o doutorado.

“O homem é assombrado pela vastidão da eternidade. Por isso nos perguntamos...

Nossas ações ecoarão através dos séculos? Não sabemos. “Resta-nos o precioso ofício de investigar e fornecer aos séculos que virão ao menos um mapa de nossas tentativas”.

Guilherme de Oliveira Ferreira, 2008.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

PAPEL DO RECEPTOR B₂ DAS CININAS E DA NADPH-OXIDASE NO DANO SECUNDÁRIO ASSOCIADO AO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Ana Paula de Oliveira Ferreira

ORIENTADOR: Luiz Fernando Freire Royes

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de novembro de 2013.

O traumatismo crânio encefálico (TCE) é uma das maiores causas de morte e de incapacitação, resultando frequentemente em disfunções neurológicas e prejuízo cognitivo. Neste contexto, tem sido demonstrado que a bradicinina, o principal metabólito do sistema caliceína-cininas, está envolvida no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, na formação de edema e no acúmulo de leucócitos induzidos pelo TCE. Achados experimentais também indicam uma interconexão entre os receptores das cininas e a atividade da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH)-oxidase. Esta enzima é uma conhecida produtora de radical superóxido e também parece estar envolvida na toxicidade induzida pelo TCE. Embora se conheça o envolvimento do sistema caliceína-cininas e da atividade da NADPH-oxidase na neuroinflamação desencadeada pelo TCE, poucos trabalhos têm avaliado seus efeitos no desenvolvimento do déficit cognitivo pós-traumático. Diante disto, o presente estudo avaliou o papel dos receptores das cininas (B₁ e B₂) e da apocinina (um inibidor da NADPH-oxidase) nos déficits neuromotor e de memória, bem como no volume de lesão cortical e nas alterações oxidativas e inflamatórias induzidas pelo modelo de lesão cerebral moderada por percussão de fluido lateral em camundongos. Para tanto, avaliou-se os efeitos dos antagonistas dos receptores das cininas dos subtipos B₁ (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina) e B₂ (HOE-140) e da apocinina, injetados subcutaneamente 30 min e 24 horas após o trauma. O presente estudo demonstrou que tanto o HOE-140, como a apocinina protegeram contra o prejuízo de memória desencadeado pelo trauma, mas não apresentaram efeitos estatisticamente significantes sobre a disfunção motora. Cabe salientar que os testes de ansiedade e locomoção indicam que a melhora de memória alcançada com os tratamentos não se devem a interferências inespecíficas sobre a execução do teste de memória. O tratamento com HOE-140 atenuou ainda a atividade da NADPH-oxidase, reforçando a interconexão entre o receptor B₂ e a enzima. Além disso, ambos os tratamentos foram eficazes em atenuar, em córtex ipsilateral, os parâmetros inflamatórios (níveis de interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α e de metabólitos do óxido nítrico) e o dano oxidativo (lipoperoxidação, carbonilação proteica e inibição da Na⁺, K⁺ATPase) induzidos pelo modelo estudado. Por outro lado, apenas o tratamento com HOE-140 obteve uma redução estatisticamente significativa sobre o edema cerebral. Os resultados apresentados permitem concluir que as cininas, por ação do receptor B₂ e possivelmente da NADPH oxidase, estão envolvidas na neuroinflamação e no estresse oxidativo. Além disso, é plausível que a excessiva ativação dos receptores B₂ seguida da ativação da enzima NADPH-oxidase facilite a progressão da lesão cortical repercutindo, desta forma, na deterioração da memória de reconhecimento de objetos.

Palavras-chave: Bradicininina. Traumatismo Cranioencefálico por Percussão de Fluido. Memória de Reconhecimento. NADPH-oxidase.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology
Federal University of Santa Maria

ROLE OF RECEIVER B₂ KININ AND NADPH-OXIDASE IN SECONDARY DAMAGE INDUCED BY TRAUMATIC BRAIN INJURY IN MICE

AUTHOR: Ana Paula de Oliveira Ferreira

ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes

Date and Place: Santa Maria, November 22, 2013.

Traumatic brain injury (TBI) is a major cause of death and disability. This condition results in neurological and cognitive impairment. In this context, it has been demonstrated that bradykinin, the main metabolite of the kallikrein-kinins system is involved in the increased permeability of the blood-brain barrier, in edema formation and leukocyte accumulation induced by TBI. Experimental findings also indicate an connection between kinin receptors and the activity of the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase, an enzyme that produces superoxide radical. It is known that the kallikrein-kinin and NADPH-oxidase activity participate of neuroinflammation triggered by TBI. However, few studies have evaluated their effects on the development of posttraumatic cognitive impairment. Hence, the present study evaluated the role of kinin receptors (B₁ and B₂) and the NADPH-oxidase inhibitor (apocynin) in neuromotor deficits, memory impairment, cortical lesion volume, oxidative and inflammatory damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice. Therefore, we determined the effects of kinin receptors antagonists (des - Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin and HOE-140) and apocynin injected subcutaneously 30 min 24 hours post trauma. The present study demonstrated that both, HOE-140 and apocynin, protected against memory impairment triggered by trauma, but showed no effects in motor dysfunction caused by TBI. It should be noted that memory improvements was not due to nonspecific effects over the memory test, because the pharmacological treatment used in this study did no alter locomotor and/or anxiety-like behavioral. Treatment with HOE-140 also attenuated the NADPH-oxidase activity, reinforcing the connection between the B₂ receptor and this enzyme. Moreover, both treatments attenuated the ipsilateral cortex inflammation (levels of interleukin-1 β , tumoral necrosis factor- α and nitric oxide metabolites) and oxidative damage (lipid peroxidation, protein carbonylation and inhibition of Na⁺, K⁺ ATPase) induced by tested model. On the other hand, only treatment with HOE-140 reduced the cerebral edema. The results presented in this study suggest that kinins, through of the B₂ receptor and possibly through NADPH-oxidase, are involved in neuroinflammation and oxidative stress caused by trauma. Moreover, it is plausible that excessive activation of B₂ receptors and subsequent activation of the enzyme NADPH-oxidase facilitate the cortical lesion progression resulting in deterioration of object recognition memory.

Keywords: Bradykinin. Fluid Percussion. Brain injury. Recognition memory. NADPH-oxidase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala de coma de Glaslow	35
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado dos processos moleculares iniciados após uma lesão focal.....	42
Figura 2 – Processo molecular e celular desencadeado por lesões difusas.....	44
Figura 3 – Representação da ativação das células da glia após uma lesão no sistema nervoso central.....	46
Figura 4 – Representação das células formadoras da barreira hematoencefálica.....	47
Figura 5 – As duas principais rotas formadoras de cininas (bradicinina e calidina).....	55
Figura 6 – Representação esquemática do envolvimento da cininas na abertura da barreira hematoencefálica.....	69
Figura 7 – Representação esquemática da ativação da NADPH-oxidase.....	63
Figura 8 – Representação esquemática da conclusão da presente Tese	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
B ₁ R	Receptor B ₁ das cininas
B ₂ R	Receptor B ₂ das cininas
BHE	Barreira hematoencefálica
BK	Bradicinina
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças do Governo dos Estados Unidos da América
DAD	Dano axonal difuso
DAMPs	Padrões moleculares associados a perigo
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECG	Escala de coma de Glasgow
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
FXII	Fator doze da cascata da coagulação
Gi	Proteína G inibitória
Gq	Proteína G acoplada a fosfolipase C
HK	Cininogênios de alto peso molecular
ICC	Impacto cortical controlado
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KD	Calidina
LCF	Lesão em cabeça fechada
LK	Cininogênios de baixo peso molecular
MAPK	Quinase ativadas por mitógeno
MMP	Matriz metaloproteinase

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento do nervo
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOX	Subunidade catalítica da NADPH-oxidase
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PFL	Percussão de fluido lateral
PG	Prostaglandina
PIC	Pressão intracraniana
PK	Caliceína plasmática
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PPMT	Poros de permeabilidade mitocondrial transitório
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TK	Caliceína tecidual
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	27
INTRODUÇÃO	31
1.1. TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO (TCE).....	33
1.1.1. Definição e quadro epidemiológico	33
1.1.2. Classificação do TCE	34
1.1.2.1. Classificação quanto à gravidade das lesões	34
1.1.2.2. Classificação quanto ao mecanismo físico de lesão	36
1.1.2.3. Classificação quanto à distribuição das lesões	36
1.1.2.4. Classificação quanto à progressão das lesões.....	37
1.1.3. Disfunções relacionadas ao TCE.....	38
1.1.4. Modelos Experimentais de TCE	39
1.1.5. Fisiopatologia do dano secundário associado ao TCE	40
1.1.5.1. Mecanismos fisiopatológicos das lesões focais.....	41
1.1.5.2. Mecanismos fisiopatológicos das lesões difusas.....	43
1.1.5.3. Mecanismos fisiopatológicos da neuroinflamação.....	45
1.2. SISTEMA CALICREÍNA-CININAS	53
1.2.1. Conceito e funções	53
1.2.2. Mecanismos de síntese de cininas.....	53
1.2.2.1. Sistema de Contato.....	54
1.2.2.2. Sistema Tecidual	54
1.2.3. Degradação das cininas.....	55
1.2.4. Receptores de cininas	56
1.2.4.1. Cascata de transdução de sinal dos receptores B ₁ e B ₂	56
1.2.5. Sistema Calicreína-cininas no TCE	57
1.3. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTIDEO FOSFATO (NADPH)- OXIDASE	61
1.3.1. Função da NADPH-oxidase no sistema nervoso central.....	61
1.3.2. Mecanismo de ativação da NADPH-oxidase.....	62
1.3.3. NADPH-oxidase e neurodegeneração.....	64
1.3.4. NADPH-oxidase e o TCE.....	65
1.3.5. Bradicinina, produção de EROs e atividade da NADPH-oxidase	67
OBJETIVOS	69

2.1. OBJETIVOS GERAIS	71
2.1.1. Capítulo I:	71
2.1.2. Capítulo II:.....	71
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
2.2.1. Capítulo 1:.....	73
2.2.2. Capítulo II:.....	75
ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	77
3.1. Capítulo I:.....	79
3.1.1. HOE-140 protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice.....	79
3.2. Capítulo II:	95
3.2.1. The effect of NADPH-oxidase inhibitor Apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage.	95
DISCUSSÃO.....	109
4.1 DISCUSSÃO.....	111
CONCLUSÕES	117
5.2. CAPÍTULO II:	121
5.3. CONCLUSÃO FINAL.....	123
REFERÊNCIAS.....	125
6.1. REFERÊNCIAS.....	127

No item INTRODUÇÃO, está descrita uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados nesta tese. Os resultados que fazem parte desta tese estão sob a forma de dois artigos, os quais se encontram, no item ARTIGOS CIENTÍFICOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos artigos e representam a íntegra deste trabalho. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÕES encontrados no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO desta tese.

1.1. TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO (TCE)

1.1.1. Definição e quadro epidemiológico

Por definição, o TCE é “uma agressão ao cérebro, de natureza não degenerativa e não congênita causada por uma força física externa, que pode produzir um estado diminuído ou alterado de consciência” (UMPHRED, 1994). Essa condição é considerada um problema de saúde em ascensão tendo em vista a ocorrência de grande número de acidentes automotores e dos crescentes índices de violência urbana (ARREOLA-RISA et al., 1995). Nos últimos anos, o traumatismo cranioencefálico alcançou o patamar de epidemia mundial e vem sendo associado a altos índices de morbidade e mortalidade, além de trazer consigo expressivos impactos socioeconômicos (ZITNAY, 2005).

A Organização Mundial de Saúde revela o óbito de 5 milhões de pessoas em decorrência de TCE anualmente, o que representa 9% de todos os falecimentos mundiais ocorridos em um ano (WHO, 2009). Dados disponibilizados pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) do Governo americano também alertam para a dimensão dessa condição de saúde. O relatório do CDC revelou uma incidência 1.700.000 novos casos, a cada ano, nos Estados Unidos da América (EUA). Desse número, 52.000 pacientes falecem, 275.000 necessitam de tratamento hospitalar intensivo e 1,365 milhão são tratados e liberados dos departamentos de emergência. Além disso, há uma estimativa que mais de 98.000 pacientes permanecem com alguma incapacidade ou déficit neurológico a cada ano nos EUA (KRAUS e CHU, 2005). Em razão disso, tem-se uma população de 5,3 milhões de pessoas que convivem com as graves sequelas do TCE, gerando uma despesa anual de 76,5 bilhões de dólares para os cofres públicos americanos (FAUL et al., 2010; CORONADO et al., 2011).

No Brasil, os estudos epidemiológicos são escassos e, em sua maioria, seccionados por regiões, o que dificulta a interpretação da situação como um todo. O único trabalho epidemiológico de âmbito nacional disponível foi realizado pela Universidade Federal da Bahia. O trabalho realizou uma análise epidemiológica das internações hospitalares em decorrência do TCE no Sistema Único de Saúde Brasileiro (FERNANDES, 2010). Esse estudo verificou que as internações se concentram na região sudeste (43%) do Brasil, entre os indivíduos do sexo masculino (81,5%), na faixa etária de 14-35 anos (53%). Entretanto, é na

faixa etária de 35-69 anos que se observa o maior coeficiente de letalidade hospitalar. As quedas (35,2%) e os acidentes de trânsito (22,88%) parecem ser as circunstâncias que mais contribuem para ocorrência do TCE, mesmo que os acidentes motociclísticos tenham apresentado um aumento expressivo (75%) nos últimos anos do período estudado (2001-2007). Os estudos regionais realizados nos estados de Pernambuco, Santa Catarina e Bahia apresentam perfis epidemiológicos semelhantes ao descrito acima e ainda demonstram uma preponderância de casos leves e graves (MELO, SILVA e MOREIRA, 2004; MOURA et al., 2011; RUY e ROSA, 2011).

1.1.2. Classificação do TCE

O TCE resulta em lesões ao parênquima cerebral que ocorrem em consequência da lesão mecânica e de um complexo mecanismo fisiopatológico desencadeado pelo dano. Para facilitar o estudo deste imbricado quadro, estudiosos classificaram as lesões advindas do mesmo de acordo com: a) à gravidade das lesões (lesões leves, moderadas ou graves); b) ao mecanismo físico de lesão (lesões por contato ou por aceleração/desaceleração); c) à distribuição das lesões (lesões focais ou difusas); d) à progressão das lesões (lesões primárias e secundárias).

1.1.2.1. Classificação quanto à gravidade das lesões

Embora se disponha de modernas tecnologias para classificação dos diferentes tipos de enfermidades, o TCE ainda é amplamente classificado com base em sinais clínicos principalmente no momento da admissão no serviço de saúde (ROSENFELD et al., 2012). A Escala de coma de Glasgow (ECG) é a ferramenta mais utilizada atualmente para dividir grosseiramente os pacientes em três categorias: leve, moderado e grave (SAATMAN et al., 2008). Essa escala atribui escores para sinais clínicos como: abertura dos olhos, resposta motora e resposta verbal. A soma dos escores é, então, utilizada para categorizar os pacientes.

Escala de coma de Glasgow

Abertura dos olhos (O)	Espontânea	4
	Ao falar	3
	Ao sentir dor	2
	Olhos sempre fechados	1
Melhor resposta motora (M)	Obedecer	6
	Localizar	5
	Reflexo de retirada	4
	Flexão anormal	3
	Resposta extensora	2
	Sem resposta motora	1
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 Glaslow – Tabela usada para avaliar, em humanos, a gravidade do trauma na chegada em unidades de saúde. Adaptada de KRAUS e CHU (2005).

O trauma leve se caracteriza por produzir um escore de ECG de 13 ou mais e os pacientes são comumente assintomáticos. Quando os sintomas estão presentes, os mais frequentes são dor de cabeça, náusea e vômitos. Alguns pacientes podem também apresentar uma leve e transitória desorientação e amnésia nas primeiras horas que seguem o trauma (DECUYPERE e KLIMO, 2012). Já os pacientes com TCE moderado apresentam uma ECG de 9 -12 e os sintomas clínicos podem variar amplamente. As pessoas acometidas podem sofrer perda de consciência, convulsão pós-traumática leve, déficits neurológicos focais, porém ainda respondem a comandos. O TCE moderado também está associado a uma maior probabilidade de resultados anormais em exames de neuroimagem (DECUYPERE e KLIMO, 2012). Os pacientes que sofrem TCE grave apresentam ECG de 8 ou menos. Contusões intracranianas, hematomas e lacerações cerebrais formam o grupo de lesões normalmente incluídas nessa categoria. Os indivíduos frequentemente necessitam de intervenção cirúrgica e contínuo monitoramento da pressão intracraniana (PIC). A taxa de mortalidade pode atingir

60% dos pacientes adultos. A recuperação é longa (mais de um ano) e normalmente incompleta (DECUYPERE e KLIMO, 2012).

1.1.2.2. Classificação quanto ao mecanismo físico de lesão

Esse tipo de classificação permite entender como forças específicas, em magnitudes específicas, agem sobre o parênquima cerebral. Desta forma, é possível prever quais padrões de lesões provavelmente resultarão do TCE (SAATMAN et al., 2008).

De acordo tal sistema, as lesões podem ser por contato, quando resultam do impacto de um objeto sobre a cabeça ou do contato do cérebro com o crânio. Esse tipo de lesão frequentemente associa-se a quedas e perfurações (GENNARELLI e GRAHAM, 2005).

Um segundo tipo de lesão resulta de forças de aceleração e desaceleração. Nesse caso, não é necessário o impacto do crânio com estruturas externas. O crânio e as diferentes estruturas cerebrais desfrutam de densidades desiguais. Assim, quando ocorre o movimento brusco da cabeça, esses tecidos movimentam-se em velocidades díspares. Isso faz com que o cérebro se movimente dentro da caixa craniana (FERREIRA et al., 2009), gerando forças de cisalhamento, tensão e compressão que agem sobre o tecido cerebral (GENNARELLI e GRAHAM, 2005). A ruptura de vasos sanguíneos, as lesões dos axônios e a laceração do tecido cerebral são a resultante de todo esse processo (FERREIRA et al., 2009). As lesões por aceleração e desaceleração ficam normalmente atreladas a acidentes de trânsito e quedas de grandes alturas (GENNARELLI e GRAHAM, 2005).

1.1.2.3. Classificação quanto à distribuição das lesões

A análise clínica e neurorradiológica das lesões possibilita a classificação do TCE em focal ou difuso (GRAHAM, GENNARELLI e MCINTOSH, 2002). No TCE focal, o dano é produzido frequentemente por trauma de contato, resultando em compressão focal das estruturas cerebrais localizadas abaixo do crânio do lado do impacto, bem como no lado oposto à agressão. Esse tipo de lesão causa lacerações e hematomas e extensiva morte celular local (GENNARELLI e GRAHAM, 2005; ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010). Já no

TCE difuso, o mecanismo responsável pelas lesões é a aceleração e desaceleração (Gennarelli & Graham 2005). Nesse caso, o principal achado fisiopatológico é o dano axonal difuso (DAD) (ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010). Embora apresentem características patofisiológicas diferenciadas, os dois tipos de lesões traumáticas (focais e difusas) causam quadros clínicos semelhantes. Ambos os tipos de lesão podem causar coma, perda de consciência, amnésia pós-traumática e disfunções motoras (ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010).

1.1.2.4. Classificação quanto à progressão das lesões

Em um quarto sistema de classificação, utilizam-se como base os mecanismos patofisiológicos envolvidos no TCE, bem como seus possíveis alvos terapêuticos. Neste quadro classificatório emergem o dano primário e o dano secundário.

Em geral, a lesão primária compreende o dano mecânico imediato e irremediável ao parênquima cerebral que ocorre no momento do trauma (GENNARELLI e GRAHAM, 2005; WERNER e ENGELHARD, 2007; SAATMAN et al., 2008). Nesse tipo de lesão, estão incluídas as lacerações ao tecido cerebral, os danos aos vasos sanguíneos (hemorragias e hematomas) e as axotomias primárias (rompimentos axonais) (GAETZ, 2004). Desta forma, o dano primário não é passível de tratamento, podendo ser apenas evitado com políticas socioeducativas de incentivo ao uso de capacetes, de combate à violência urbana e no trânsito (XIONG, MAHMOOD e CHOPP, 2013).

Por outro lado, o dano secundário abrange todos os eventos metabólicos, celulares e moleculares que se iniciam minutos após a lesão primária e em decorrência da mesma. A evolução dessas cascatas pode perdurar por dias, meses e até anos após a lesão, causando significativa morte celular, atrofia tecidual e consequentemente déficits funcionais nos indivíduos acometidos (GENNARELLI e GRAHAM, 2005). A natureza prolongada do dano secundário cria uma janela temporal que permite intervenções terapêuticas que podem prevenir e/ou reduzir as sequelas do paciente em longo prazo (XIONG, MAHMOOD e CHOPP, 2013).

As alterações neuroquímicas mais associadas ao dano secundário incluem uma ampla variedade de processos, tais como: edema cerebral, distúrbio da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), aumento da PIC, dano cerebral isquêmico, excitotoxicidade,

estresse oxidativo e nitrosativo, disfunção mitocondrial e consequente déficit de adenosina trifosfato (ATP), DAD, deposição amiloide, inflamação, apoptose e necrose celular (WERNER e ENGELHARD, 2007; AARABI e SIMARD, 2009).

1.1.3. Disfunções relacionadas ao TCE

O TCE está relacionado a uma significativa diminuição na qualidade de vida do afetado e seus familiares (SERNA e SOUSA, 2005; RIGGIO, 2010). Após a lesão, o vitimado passa a manifestar sequelas que incluem problemas vasculares e neurológicos, incapacidades de origem física e cognitiva, bem como problemas comportamentais/emocionais (RIGGIO, 2010).

Uma das frequentes sequelas do TCE é a disfunção motora. A função motora é mediada por uma complexa rede neural originária no córtex e que se estende até os músculos esqueléticos. Tal rede inclui estruturas (córtex, córtex sensorio-motor, núcleo subcortical, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal) cuja correta comunicação coordena os movimentos (VANDER, SHERMAN e LUCIANO, 2001). Acredita-se que lacerações ou perturbações neuroquímicas em qualquer uma dessas estruturas culminem com um prejuízo na funcionalidade motora do indivíduo afetado (FUJIMOTO et al., 2004).

O prejuízo cognitivo, por sua vez, é a mais frequente e persistente sequela encontrada nos pacientes de TCE (CICERONE et al., 2000). Em humanos, a cognição é definida como o processo que inclui a discriminação, a seleção, a aquisição, a compreensão e a retenção, bem como a expressão e a aplicação de informações em situações apropriadas. O déficit cognitivo inclui qualquer redução da eficiência ou velocidade deste processo ou no desempenho de atividades rotineiras (CICERONE et al., 2000). Segundo JUNQUE (1999), as lacerações que interferem nas circuitarias da porção dorsolateral do parênquima neural, bem como atrofia hipocampal e parahipocampal e o dano axonal são as principais lesões responsáveis pelas deficiências cognitivas citadas acima.

Estudos experimentais utilizando ratos ou camundongos também descrevem algumas alterações neuroquímicas como responsáveis pelo déficit cognitivo associado ao TCE. Neste sentido, as mudanças na neurotransmissão glutamatérgica (BIEGON et al., 2004; SCHWARZBACH et al., 2006; HAN et al., 2009), colinérgica (ARCINIEGAS, 2003), a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)s ou nitrogênio (ERN)s (MARKLUND et al.,

2001; ABDEL BAKI et al., 2010; AIGUO, ZHE e GOMEZ-PINILLA, 2010; SINGLETON et al., 2010) e o aumento dos níveis de citocinas pro-inflamatórias (SANDERSON et al., 1999; SCHERBEL et al., 1999; BERMPOHL et al., 2007; CLAUSEN et al., 2009; KHUMAN et al., 2011) mostraram-se implicadas na referida sequela. Ademais, estudos de nosso grupo também indicam que o mau funcionamento da enzima sódio (Na^+), potássio (K^+) ATPase pode desempenhar um importante papel na fisiopatologia do déficit de memória espacial induzido pelo PFL em ratos (LIMA et al., 2008).

Embora não haja consenso quanto ao papel da morte celular nessa disfunção, alguns estudos demonstram uma melhora no desempenho cognitivo de camundongos tratados com inibidores de morte celular como necrostatina e o inibidor das caspases inibidor z-VAD-fmk (KNOBLACH et al., 2002; YOU et al., 2008). Nesta mesma linha, trabalhos também mostram que a piora da memória e a perda neuronal parecem ser eventos concomitantes ou correlacionáveis em diferentes espécies de roedores submetidas a diferentes modelos de trauma cerebral (HICKS et al., 1993; FOX et al., 1998; MARKLUND et al., 2001; CLAUSEN et al., 2005; HAN et al., 2009; LEVY et al., 2009; ABDEL BAKI et al., 2010; AIGUO, ZHE e GOMEZ-PINILLA, 2010; SINGLETON et al., 2010).

Embora se disponha de resultados experimentais positivos e de estratégias de reabilitação, ainda não se conhece um tratamento farmacológico que efetivamente apresente resultados nos déficits cognitivo e motor causado pelo TCE humano.

1.1.4. Modelos Experimentais de TCE

A alta incidência mundial do TCE e as devastadoras sequelas a ele associadas produziram a necessidade de ampliar o entendimento da fisiopatologia das lesões traumáticas, bem como o estudo de novos tratamentos. Nesse sentido, nas últimas três décadas, modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de replicar os abstrusos aspectos do TCE humano (XIONG, MAHMOOD e CHOPP, 2013). Dentre esses, podemos citar quatro modelos mais amplamente utilizados:

A) modelo de trauma por lesão em cabeça fechada (LCF), conhecido em inglês como “*close head injury*” ou “*weight-drop*”, onde um peso em queda livre atinge o crânio exposto com ou sem craniectomia (MORALES et al., 2005);

B) modelo de trauma por impacto cortical controlado (ICC) que utiliza um pistão pneumático, cujo jato de ar deforma lateralmente a dura-máter (membrana cerebral mais externa) causando lesões predominantemente focais (MORALES et al., 2005);

C) modelo de trauma por lesão por ondas de explosão que avalia o efeito de ondas de choque sobre o parênquima cerebral na tentativa de mimetizar os efeitos de explosões à bomba (RENEER et al., 2011).

D) modelo de trauma por lesão por percussão de fluido lateral (PFL), onde o insulto cerebral é induzido por uma injeção de fluido sobre a dura-máter através de uma craniectomia (THOMPSON, SEBASTIANELLI e SLOBOUNOV, 2005).

Segundo THOMPSON, SEBASTIANELLI e SLOBOUNOV (2005), o modelo de PFL é um dos modelos mais clinicamente relevantes, produzindo alterações comportamentais, fisiológicas e histológicas já amplamente documentadas em ratos. Nesse sistema, a percussão do fluido produz uma breve deformação no tecido cerebral, num processo em que a gravidade da lesão depende da intensidade da pressão do pulso de fluido (MCINTOSH et al., 1989). O PFL produz uma combinação de danos corticais focais aliadas a lesões difusas em estruturas como hipocampo e tálamo. O córtex contundido abaixo da lesão inicial, em semanas, torna-se uma cavidade forrada por glia que continua a expandir-se por até 1 ano (BRAMLETT e DIETRICH, 2002). Ao longo dos meses, as cascatas degenerativas persistem em regiões vulneráveis como hipocampo ipsilateral, tálamo, septo medial, estriado e amígdala (HICKS et al., 1996; THOMPSON et al., 2005; LIU et al., 2010). Aliado a isso, o PFL ainda produz déficits neurocomportamentais e cognitivos, tais como dificuldades motoras e prejuízos de memória, que são comumente vistos em pacientes com TCE (MORALES et al., 2005).

1.1.5. Fisiopatologia do dano secundário associado ao TCE

Para o melhor entendimento da fisiopatologia do dano secundário, a literatura contemporânea vem analisando separadamente as cascatas desencadeadas pelas lesões focais e difusas (GAETZ, 2004; ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010). Entretanto, é importante ressaltar que tais processos podem ocorrer simultaneamente e interagir entre si em um único paciente (SKANDSEN et al., 2010).

1.1.5.1. Mecanismos fisiopatológicos das lesões focais

Um dos principais eventos secundários envolvidos no trauma focal é a isquemia (GENNARELLI, 1993; GENNARELLI e GRAHAM, 2005). As lesões focais produzem zonas de profunda redução no fluxo sanguíneo cerebral que podem levar à necrose neuronal por isquemia (BULLOCK et al., 1991). Isso porque, ao mesmo tempo em que se estabelece essa redução no aporte de oxigênio, há um aumento na glicólise na tentativa de suprir a alta demanda energética requerida pela Na^+, K^+ ATPase que luta para reestabelecer o equilíbrio iônico da célula (KAWAMATA et al., 1995). A falta de energia leva ao mau funcionamento das bombas iônicas de membrana, desencadeando a despolarização dos terminais nervosos, a excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (GAETZ, 2004) e o estabelecimento do edema citotóxico.

O principal neurotransmissor excitatório envolvido na excitotoxicidade induzida pelo TCE é o glutamato (BULLOCK et al., 1995; GLOBUS et al., 1995). De fato, o aumento dos níveis extracelulares desse neurotransmissor é uma conhecida consequência do TCE em humanos e em modelos experimentais (BULLOCK et al., 1995; GLOBUS et al., 1995; BULLOCK et al., 1998). Estudos mostram que o excesso do mesmo leva ao acúmulo de íons cálcio (Ca^{++}) intracelular, o que resulta na abertura de poros na membrana mitocondrial, chamados de poros de permeabilidade mitocondrial transitório (PPMT). A presença desses poros é a responsável pela despolarização da membrana mitocondrial interna e, conseqüentemente, pela diminuição da produção energética (KRISTAL e DUBINSKY, 1997; SCORRANO, PETRONILLI e BERNARDI, 1997; XIONG et al., 1997; PATERGNANI et al., 2011). Por meio dos PPMT, as EROs produzidas pela mitocôndria danificada e o citocromo c, presente no espaço intermembrana da mitocôndria, são liberados para o citoplasma (BUKI et al., 2000; SULLIVAN et al., 2002; CHENG et al., 2012) iniciando o processo de apoptose.

Por outro lado, em condições de baixo aporte de energia, o excesso de Ca^{++} intracelular desencadeia o processo de necrose, através da ativação de serina proteases como a calpaína (SAATMAN, CREED e RAGHUPATHI, 2010). A ativação dessas enzimas leva à clivagem de proteínas estruturais (SCHOCH et al., 2012), o que culmina com morte celular por necrose (YAMASHIMA et al., 2003).

Ademais, o excesso de Ca^{++} também ativa enzimas dependentes de Ca^{++} como: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a fosfolipase

A₂ e também as enzimas geradoras de superóxido (O₂⁻) (GAETZ, 2004). A produção de óxido nítrico (NO) associada à produção EROs leva à formação de uma poderosa ERN, o peroxinitrito, que, por sua vez, danifica as membranas, as proteínas e o DNA celular (RADI et al., 1991; CHERIAN, HLATKY e ROBERTSON, 2004; LAU e TYMIANSKI, 2010). O peroxinitrito (ONOO⁻) é também capaz de iniciar um processo de apoptose independente de caspases, conhecido como necro-apoptose (KOMJATI, BESSON e SZABO, 2005). Nesse processo, o DNA danificado pelo ONOO⁻ inicia uma cascata que culmina com liberação do fator indutor de apoptose do interior da mitocôndria, o qual causa a condensação e a lise da cromatina, desencadeando, assim, o processo de apoptose (LORENZO e SUSIN, 2007; BARITAUD et al., 2010). A figura 1 esquematiza as lesões focais.

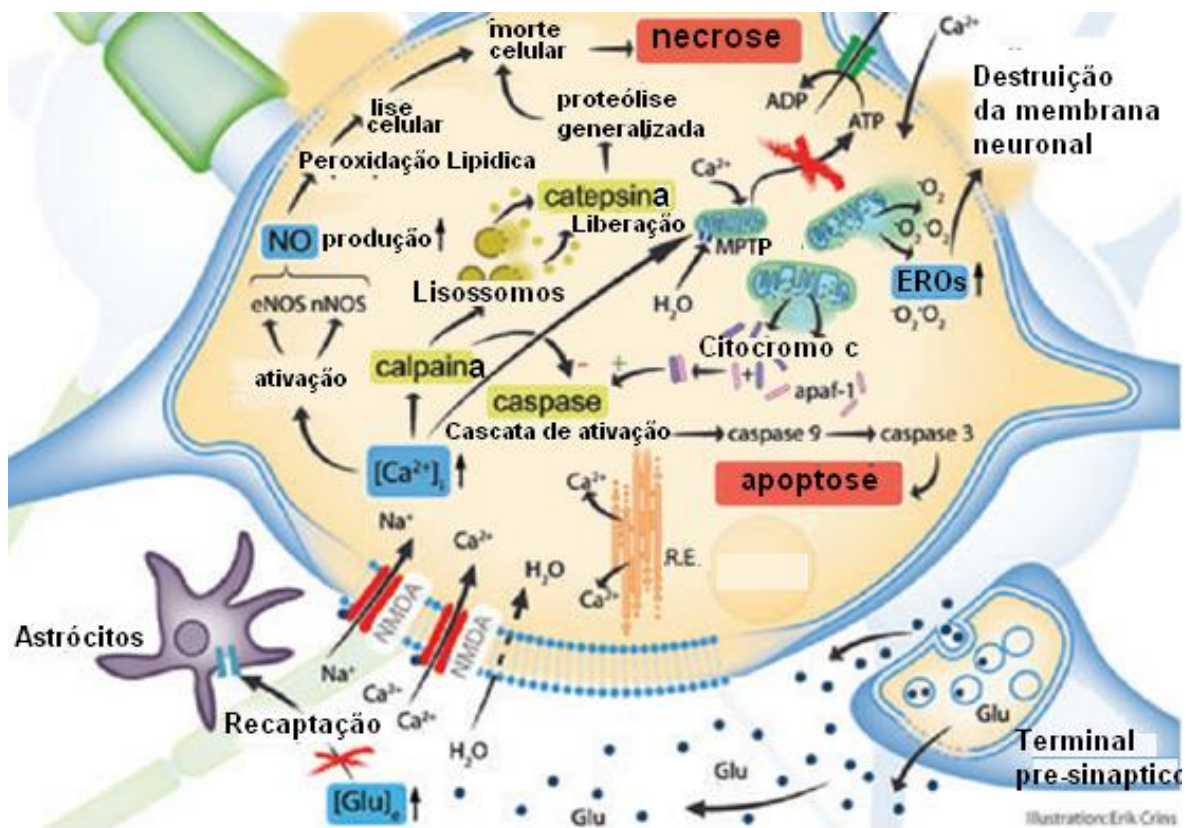


Figura 1 – Esquema simplificado dos processos moleculares iniciados após uma lesão focal – Em suma, o aumento do glutamato extracelular resulta num influxo Ca⁺⁺ suprafisiológico que inicia várias cascatas intracelulares que operam em paralelo. No canto superior esquerdo: Aumento da atividade das enzimas dependentes de cálcio, nNOS e eNOS, aumentam a produção de NO, levando à peroxidação lipídica e eventualmente à morte celular por necrose. Na parte do meio da esquerda: A atividade da calpaína também é aumentada devido ao excesso de cálcio intracelular, resultando, em última análise, nas vias de necrose celular. A ruptura da membrana lisossomal e a liberação da cathepsina desempenham um papel importante nesse processo. No canto superior direito: o aumento de cálcio intracelular resulta na sobrecarga de cálcio mitocondrial causando o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Como resultado dessa disfunção mitocondrial, tem-se estresse oxidativo, a liberação citocromo-c no citoplasma, o qual inicia a rota apoptótica. Glu: Glutamato; [Glu]_e: concentração de glutamato extracelular; R E.: retículo endoplasmático [Ca⁺⁺] concentração de cálcio

intracelular; nNOS: NOS neuronal; eNOS: NOS endotelial; MPTP: poro de permeabilidade mitocondrial transitório; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; EROs: espécies reativas de oxigênio; apaf-1: proteína ativadora de apoptose-1. Ilustração adaptada de ANDRIESSEN, JACOBS e VOS (2010).

Outra importante consequência do desequilíbrio iônico causado pela depleção energética é o aumento da osmolaridade intracelular. O excesso de íons no citoplasma desencadeia o influxo passivo de água para o interior da célula através das aquaporinas (canais proteicos que permitem a passagem de água), o que caracteriza o edema citotóxico (BADAUT et al., 2001; KEMPSKI, 2001; BADAUT et al., 2002). A demasiada concentração de glutamato parece também estar envolvida no edema citotóxico. Isso porque o funcionamento de seus receptores e transportadores também resulta no aumento das concentrações de Ca^{++} , Na^+ , íons hidrogênio e íons cloreto intracelulares, o que intensifica o influxo de água para o citoplasma das células (AMARA e FONTANA, 2002). O edema citotóxico é de fundamental importância no TCE, pois, inevitavelmente, leva à morte celular por necrose ou por inchaço demasiado (LIANG et al., 2007). Entretanto, esse processo, por si só, não é capaz de causar o aumento de volume cerebral característico do edema (LIANG et al., 2007). O mecanismo citotóxico aumenta a quantidade de água no meio intracelular à custa da diminuição da água no meio extracelular. Esse processo cria um novo gradiente de concentração na área necrótica central da lesão, que se torna hiperosmolar em relação ao sangue. Assim, ocorre o fluxo de água do plasma para o meio extracelular, aumentando o volume do cérebro, um processo conhecido como edema osmótico intersticial (KATAYAMA e KAWAMATA, 2003).

1.1.5.2. Mecanismos fisiopatológicos das lesões difusas

Segundo JOHNSON, STEWART e SMITH (2013), as lesões resultantes das torções mecânicas seguidas por retração axonal e vazamento do axoplasma (citoplasma axonal) constituem a axotomia primária, uma ocorrência relativamente rara. A axotomia secundária surge através de alterações patológicas da estrutura axonal que pode se prolongar por meses e anos após a lesão cerebral. Esse é o processo que concretiza o DAD característico das lesões difusas.

No processo secundário, ocorre uma alteração da permeabilidade do axolema (membrana axonal) próximo aos nódulos de Ranvier (porção axonal desprovida de bainha de mielina) (PETTUS et al., 1994) com o conseqüente aumento do influxo de Ca^{++} e inchaço mitocondrial (BUKI et al., 2000). Proteases específicas passam, então, a degradar proteínas estruturais como a tubulina e outras proteínas associadas aos microtúbulos e neurofilamentos, prejudicando o transporte axonal normal (BUKI et al., 2003; MCGINN et al., 2009). Nesse caso, não ocorre a interrupção do transporte axonal nem o inchaço axonal (STONE, SINGLETON e POVLISHOCK, 2001; MARMAROU, C. R. et al., 2005). STONE et al. (2004); FARKAS e POVLISHOCK (2007) sugerem também que, em alguns casos, pode ocorrer uma combinação entre inchaço axonal (formação de bulbos axonais) e interrupção do transporte axonal, sem excessiva alteração da permeabilidade de membrana. A figura 2 demonstra ambos os tipos de lesões axonais.

O processo de DAD culmina com rompimento ou desconexão do axônio danificado. Embora o axônio entre em processo de degeneração (conhecido como degeneração Walleriana), não ocorre necessariamente a morte do soma neuronal (SINGLETON et al., 2002). As sinapses que perderam seu “input” entram em processo de reorganização sináptica que pode ser adaptativo ou inadequado (BUKI e POVLISHOCK, 2006; JOHNSON, STEWART e SMITH, 2013).

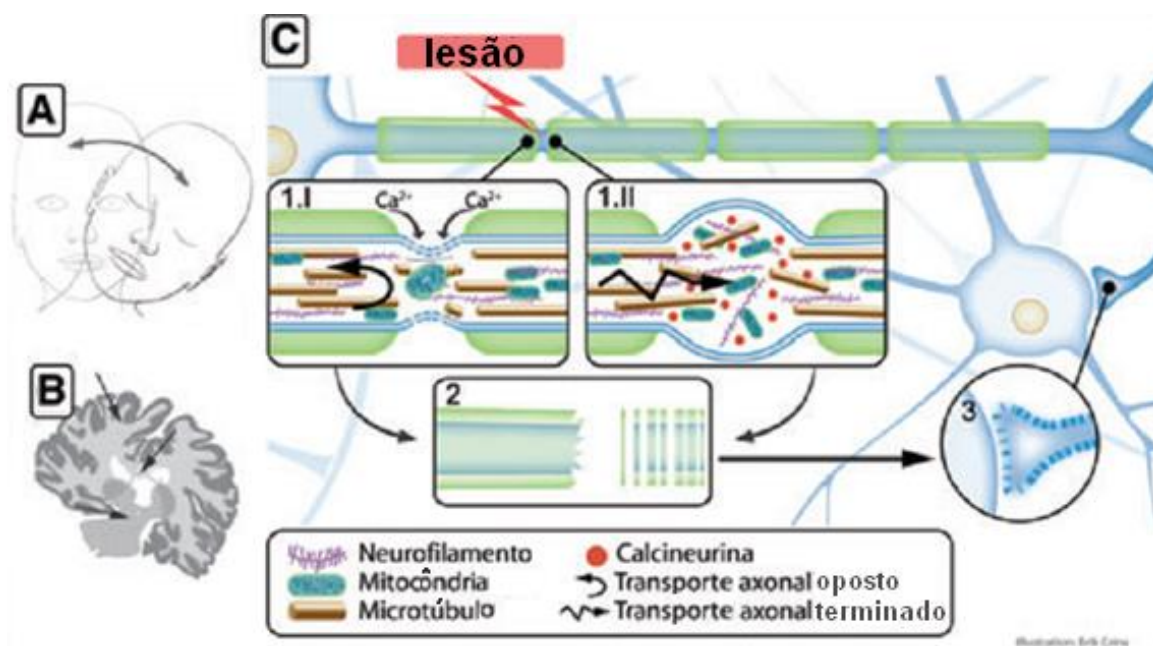


Figura 2 - Processo molecular e celular desencadeado por lesões difusas. – **A:** representa o movimento de aceleração e desaceleração lateral causador do dano axonal difuso; **B:** representa as forças de cisalhamento, tensão e compressão agindo sobre o tecido cerebral; **C:** representa em etapas os mecanismos de

dano axonal difuso; **C1.I:** representa o mecanismo de dano axonal que não apresenta inchaço ou interrupção do transporte axonal; **C1.II:** representa o mecanismo de dano axonal onde há inchaço e interrupção do transporte axonal por ação da calcineurina; **C2:** representa o processo de degeneração Walleriana; **C3:** representa a formação de novas conexões. Ilustração adaptada de ANDRIESSEN, JACOBS e VOS (2010).

1.1.5.3. Mecanismos fisiopatológicos da neuroinflamação

O processo inflamatório inclui um conjunto de cascatas celulares e moleculares iniciadas em resposta a danos teciduais cujo objetivo é preservar a homeostase do tecido. Tal resposta é mediada por inúmeras moléculas, incluindo as citocinas, quimiocinas, cininas, fatores de crescimento, NO, prostaglandina (PG)s e EROs. Além de modular a resposta inflamatória celular, essas substâncias também auxiliam na recuperação tecidual (DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Embora seja necessária, a inflamação apresenta efeitos colaterais que acabam por danificar células vizinhas saudáveis, exacerbando os danos iniciais (AUFRAY, SIEWEKE e GEISSMANN, 2009). Desta forma, a neuroinflamação é considerada um componente essencial do dano secundário associado ao TCE.

Um dos acontecimentos centrais na neuroinflamação é a ativação da micróglia (LOANE e BYRNES, 2010). As células da micróglia são dinâmicas e constantemente patrulham o seu microambiente à procura de agentes nocivos e processos prejudiciais (NIMMERJAHN, KIRCHHOFF e HELMCHEN, 2005). Elas expressam um conjunto de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares endógenos associados a perigo (DAMPs). Esses receptores permitem a micróglia identificar e reagir a estímulos nocivos e eventos danosos (BLOCK, ZECCA e HONG, 2007).

Assim, essas células respondem à presença de restos de células danificadas e proteínas plasmáticas, mudando da sua forma quiescente para forma ativa fagocitária e migratória (indiscriminável dos macrófagos) (GIULIAN et al., 1989; DAVALOS et al., 2005). A micróglia ativa passa, então, a produzir citocinas, NO, EROs, e fatores tróficos que podem exercer efeitos em células vizinhas (LU et al., 2009) e alterar a permeabilidade da BHE (CHODOBSKI, ZINK e SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011).

Os astrócitos tornam-se rapidamente ativos em resposta aos mediadores pro-inflamatórios produzidos pelos fagócitos ativos (GIULIAN et al., 1989), em um processo conhecido como astrogliose (MYER et al., 2006). Essas células produzem citocinas pro-inflamatórias, constituem os maiores produtores de quimiocinas (moléculas atratoras de células inflamatórias), e apresentam papel fundamental na abertura BHE (DONG e

BENVENISTE, 2001). Estudos também mostram que os astrócitos estão envolvidos na formação de cicatrizes gliais (DONG e BENVENISTE, 2001) e das cavidades encontradas no parênquima cerebral (LU et al., 2009). Por outro lado, os astrócitos ativos produzem e liberam fatores tróficos como neurotrofinas (RUDGE, 1993), fator de crescimento nervo (NGF) (GOSS et al., 1998), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), substâncias que têm sido relacionadas à neurogênese após o trauma. A figura 3 detalha o processo de ativação das células da glia.

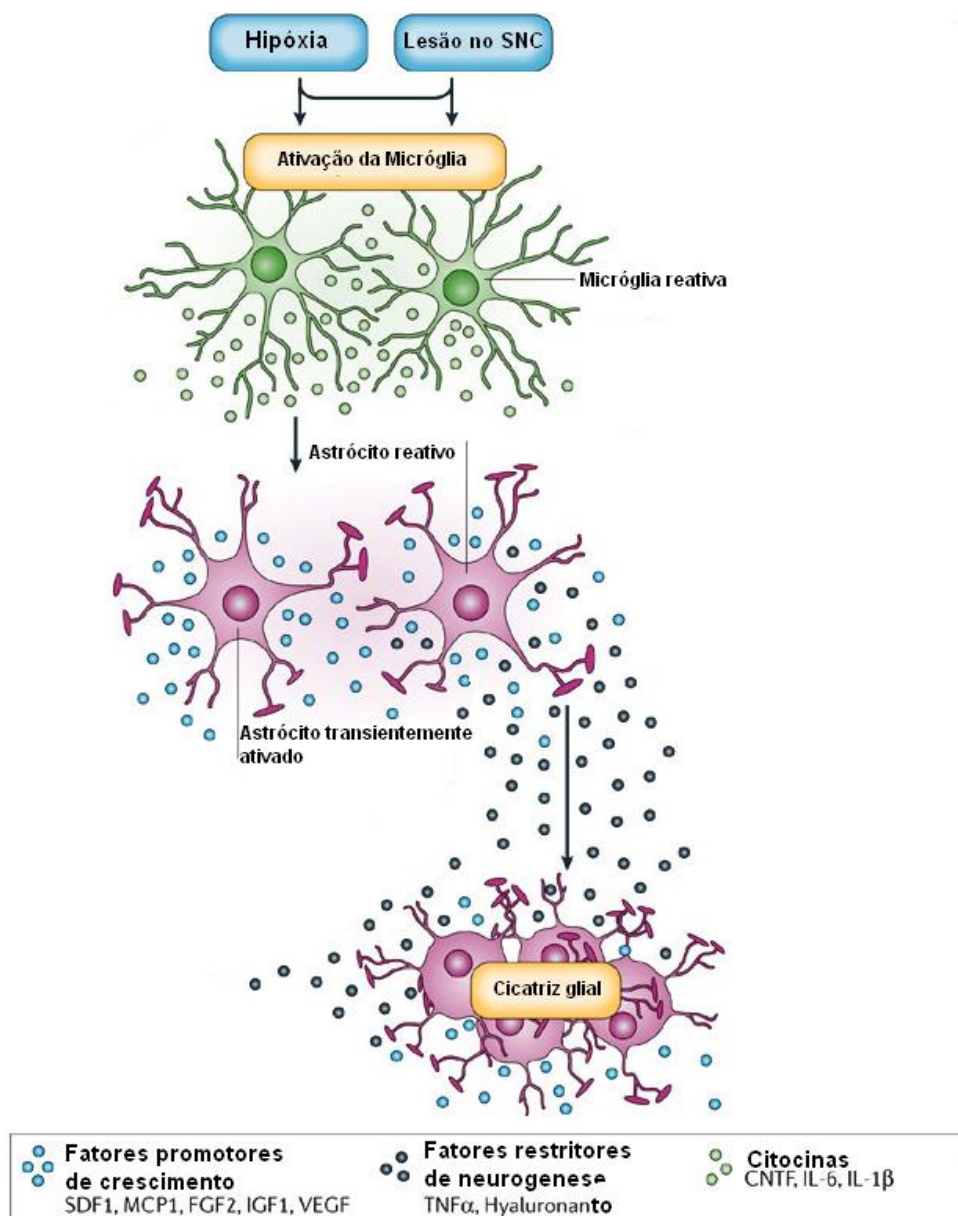


Figura 3. Representação da ativação das células da glia após uma lesão no sistema nervoso central – A lesão do parênquima neural leva à ativação da micróglia e subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 beta (IL-1β), IL-6 e fator neurotrófico ciliar (CNTF). Essas moléculas

iniciam o processo de gliose. Os astrócitos transitoriamente ativados são uma fonte de quimiocinas tais como fator derivado de células de estroma-1 (SDF1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1). Outros fatores como o FGF e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) fornecidos pelos astrócitos reativos apoiam a proliferação sobrevivência e a diferenciação celular. Outros astrócitos proliferam de forma reativa, tornam-se hipertróficos e aumentam a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Isso acaba por resultar na formação de uma cicatriz astrocitária bem compactada, que representa uma fonte de fatores que limitam as respostas regenerativas. Esse último conjunto de moléculas inclui o fator de necrose tumoral (TNF)- α e hialuronato. Ilustração adaptada de (MULLER, SNYDER e LORING, 2006).

1.1.5.3.1. Alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica

A BHE é formada por células endoteliais unidas entre si por “*tight junctions*” (cordões proteicos que atravessam as membranas celulares de células endoteliais vizinhas, mantendo-as intimamente unidas), revestidas por podócitos de astrócitos e por pericitos. Acredita-se que a micróglia também interaja fortemente com as demais células formadoras da BHE (ABBOTT, RONNBACK e HANSSON, 2006). A figura 4 mostra a estrutura normal da BHE. Em condições normais, a BHE restringe a entrada células imunológicas e de inúmeras substâncias presentes na circulação. Essa função possibilita que a BHE possa garantir a homeostase do parênquima neural, ao mesmo tempo que permite a troca de moléculas informacionais entre o sistema nervoso central (SNC) e o sangue (ABBOTT, RONNBACK e HANSSON, 2006; BANKS, 2010) .

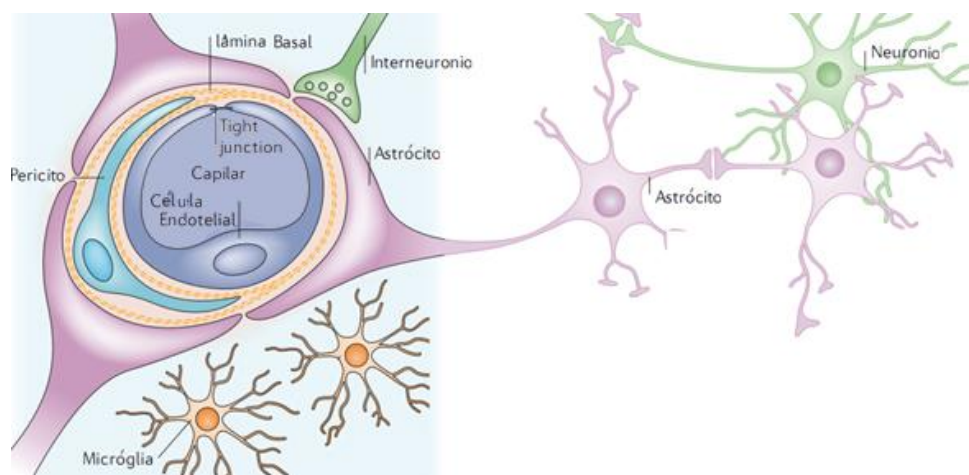


Figura 4. Representação das células formadoras da barreira hematoencefálica. - Ilustração adaptada de ABBOTT, RONNBACK e HANSSON (2006).

O aumento da permeabilidade que ocorre após o trauma se deve a vários fatores: a destruição mecânica da integridade vascular; as disfunções nas *tight junctions*; as alterações na membrana basal dos capilares sanguíneos; a mudança na expressão e/ou atividade dos transportadores associados à BHE; as alterações nas interações funcionais normais entre as células da glia (astrócitos e micróglia) e as células endoteliais (CHODOBSKI, ZINK e SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011). Todas essas alterações são desencadeadas por moléculas secretadas pelos astrócitos e micróglia. As cininas, EROs, citocinas, pro-inflamatórias (IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF)- α), glutamato, matriz metaloproteinase (MMP)s e o NO formam o referido grupo de mediadores.

Uma das maiores repercussões da disfunção da BHE é o estabelecimento do edema de origem vasogênica. Nesse tipo de edema, ocorre o movimento do plasma presente nos vasos para o espaço extracelular. Assim, o edema vasogênico não apresenta inchaço celular, mas sim, um aumento nos espaços extracelulares (UNTERBERG et al., 2004; DONKIN e VINK, 2010).

O edema cerebral é um importantíssimo evento relacionado ao dano secundário e, em casos extremos, até à morte (GAETZ, 2004). O principal dano associado ao edema é o aumento da PIC que decorre do aumento do volume cerebral (DONKIN e VINK, 2010). O excesso de pressão dentro da caixa craniana produz compressão dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, causa uma diminuição do fluxo sanguíneo. Além disso, a elevada pressão ainda pode causar esmagamento e herniações de estruturas vitais como o tronco cerebral (UNTERBERG et al., 2004; DONKIN e VINK, 2010).

Evidências experimentais têm mostrado que o edema vasogênico ocorre nas primeiras horas após o TCE (BARZO et al., 1996; O'CONNOR, CERNAK e VINK, 2006), período em que se destaca a neuroinflamação desencadeada pelo trauma. Já o edema citotóxico parece iniciar instantaneamente (período em que se estabelece o processo isquêmico), mas desenvolve-se de maneira mais lenta e duradoura, podendo persistir por até 14 dias (BARZO et al., 1997).

1.1.5.4. Mediadores pro-inflamatórios e o TCE

A comunicação entre as células durante a neuroinflamação é realizada por mediadores inflamatórios secretados pelas células locais ou pelas células inflamatórias sanguíneas. As

citocinas constituem o maior grupo de mediadores inflamatórios (CEDERBERG e SIESJO, 2010). Dessas, as citocinas pro-inflamatórias são as principais responsáveis por iniciar a neuroinflamação. Esse grupo inclui: a IL-1 α , a IL-1 β , TNF- α , o interferon- γ , e a IL-6. Elas desencadeiam a expressão de moléculas de adesão, a ativação da cascata de apoptose, a liberação de quimiocinas e a ativação de enzimas e de outras células inflamatórias (CEDERBERG e SIESJO, 2010). Por outro lado, quando se inicia o processo de resolução da inflamação, um outro grupo de citocinas ganha importância. São elas: IL-4, IL-10, IL-13 e o fator de crescimento transformador- β . Esses mediadores apresentam efeitos anti-inflamatórios e de reparação tecidual na neuroinflamação desencadeada pelo TCE (CEDERBERG e SIESJO, 2010).

No TCE, a IL-1 β tem sido amplamente caracterizada como uma promotora de neuroinflamação, estando aumentada no tecido nervoso e no líquido de roedores e pacientes nos primeiros dias após o TCE (HELMY et al., 2011). Estudos experimentais realizados em roedores indicam seu envolvimento no aumento dos níveis de várias citocinas (BASU et al., 2002; CLAUSEN et al., 2009; CLAUSEN et al., 2011), na ativação da micróglia (CLAUSEN et al., 2009) e na expressão de moléculas de adesão (BASU et al., 2002). Ela ainda parece desempenhar importante papel na neurodegeneração, (LAWRENCE, ALLAN e ROTHWELL, 1998; JONES et al., 2005; CLAUSEN et al., 2009; CLAUSEN et al., 2011) na abertura da BHE (VECIL et al., 2000), no edema cerebral (CLAUSEN et al., 2009; CLAUSEN et al., 2011) e no déficit cognitivo (SANDERSON et al., 1999; CLAUSEN et al., 2009). Entretanto, seu papel no desenvolvimento do déficit motor ainda é controverso. Enquanto sua neutralização reduziu o dano motor em camundongos submetidos ao modelo de trauma por LCF e à lesão criogênica (TEHRANIAN et al., 2002; JONES et al., 2005), outros estudos não mostraram tais melhorias independentemente da espécie e do modelo utilizados (SANDERSON et al., 1999; KNOBLACH e FADEN, 2000; CLAUSEN et al., 2009; CLAUSEN et al., 2011).

Da mesma forma que a IL-1 β , os níveis de TNF- α aumentam rapidamente após o TCE em humanos e roedores (HELMY et al., 2011). Estudos farmacológicos e com animais geneticamente modificados mostram efeitos benéficos com a supressão do TNF- α . Tais benefícios incluem melhora no desempenho motor e cognitivo (SHOHAMI et al., 1996; SHOHAMI et al., 1997; KNOBLACH, FAN e FADEN, 1999; SCHERBEL et al., 1999; BERMPOHL et al., 2007; KHUMAN et al., 2011), redução na resposta inflamatória e na taxa de apoptose (QUINTANA et al., 2005). Por outro lado, SCHERBEL et al. (1999) mostraram que, quatro semanas após o trauma, os benefícios da supressão do TNF desaparecem.

Segundo HELMY et al. (2011), tais achados sugerem que o TNF pode ser prejudicial na fase aguda, mas que a sua presença é necessária para processos regenerativos e de cura durante a fase crônica do TCE.

Embora as citocinas sejam importantes mediadores inflamatórios envolvidos no TCE, elas não são os únicos. Existe também um importante envolvimento de fatores da coagulação, fatores da cascata complemento, das cininas, do NO, entre outros. Nesta tese, nos deteremos no NO e no sistema calicreína-cininas.

O NO é um mensageiro químico gasoso que desempenha uma grande gama de funções fisiológicas no SNC. Esse mediador é sintetizado por 3 isoformas da NOS: duas constitutivas (nNOS e eNOS) e uma induzível chamada iNOS. Sob estímulo inflamatório, a iNOS passa a ser expressa em astrócitos, micróglia e células endoteliais (CHERIAN, HLATKY e ROBERTSON, 2004).

No TCE, a ativação diferencial das três isoformas da NOS gera flutuações nos níveis de NO após o trauma, criando as alterações hemodinâmicas características dessa condição (CHERIAN, HLATKY e ROBERTSON, 2004). O pico de NO que ocorre imediatamente após a lesão é provavelmente devido à ativação excitotóxica da eNOS da nNOS. Após o pico inicial de NO, pode haver um período de níveis diminuídos (MAUTES, FUKUDA e NOBLE, 1996). Esse período está associado a um baixo fluxo sanguíneo cerebral (FSC) (CHERIAN et al., 1994) e uma reduzida atividade de ambas as isoformas constitutivas da NOS (WADA, CHATZIPANTELI, BUSTO, et al., 1998). No período mais tardio, aproximadamente 24 horas após o trauma, ocorre um segundo aumento nos níveis NO. Aumento esse que se deve principalmente à atividade da iNOS (CHERIAN, HLATKY e ROBERTSON, 2004). Estudos também mostram que, nesse mesmo período de tempo, se estabelece um aumento do FSC (HAYWARD et al., 2011). A NOS induzível produz uma quantidade grande e tóxica de NO de forma sustentada (GUZIK, KORBUT e ADAMEK-GUZIK, 2003).

Ao contrário das citocinas, o NO não fica restrito a um único receptor, mas reage com estruturas como o DNA, o grupo heme da hemoglobina e com as proteínas (MARSHALL, MERCHANT e STAMLER, 2000). Muitos desses alvos são moléculas reguladoras como fatores de transcrição, o que confere ao NO um potencial regulador na neuroinflamação (BOGDAN, 2001). Entretanto, seus efeitos sobre a inflamação são ambíguos. Alguns trabalhos demonstraram que o NO diminui a migração leucocitária (GRISHAM, GRANGER e LEFER, 1998) e liberação de IL- β (KIM et al., 1998) e outros mostram que esse agente aumenta a secreção de TNF- α (ZHANG et al., 2000) e a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (HIERHOLZER et al., 1998; HIERHOLZER et al., 2002) em camundongos

submetidos à choque hemorrágico. Além disso, o seu produto, o ONOO⁻, está envolvido na necro-apoptose, na inibição da respiração mitocondrial e na ativação de neutrófilos.

Da mesma maneira, o papel das diferentes isoformas da NOS na fisiopatologia do TCE tem se mostrado contraditória. Um estudo recente sugeriu que tanto as isoformas constitutivas quanto a induzível contribuem significativamente para a formação de ONOO⁻ e consequente nitração de proteínas após o TCE em camundongos (HALL, WANG e MILLER, 2012). Ademais, o bloqueio farmacológico ou genético da iNOS parece diminuir o déficit motor (JONES et al., 2004; LOUIN et al., 2006) e cognitivo (JONES et al., 2004), a apoptose (LU et al., 2003), bem como o volume de lesão resultante do TCE em ratos (JAFARIAN-TEHRANI et al., 2005). Por outro lado, SINZ et al. (1999) não observaram melhoras na perda neuronal e nas performances motoras ou cognitivas em animais deletados para iNOS.

Tanto o derramamento sanguíneo no tecido cerebral quanto a abertura da BHE, promovem uma massiva entrada de proteínas sanguíneas no parênquima cerebral. Dentre essas proteínas temos os componentes da cascata da coagulação e do sistema caliceína-cininas (cascata geradora de cininas), o qual possui potentes mediadores inflamatórios que, por sua vez, desempenham importante papel na fisiopatologia do TCE.

1.2. SISTEMA CALICREÍNA-CININAS

1.2.1. Conceito e funções

O sistema calicreína-cininas representa uma cascata metabólica que, quando ativada, desencadeia a liberação de cininas. As principais são a bradicinina (BK) e a calidina (KD), peptídeos contendo 9 e 10 aminoácidos respectivamente (MOREAU et al., 2005) que apresentam uma meia vida curta de aproximadamente 30 s (REGOLI e BARABE, 1980; MARCEAU, HESS e BACHVAROV, 1998). Elas atuam como hormônios locais (autacóides), sendo ativas somente perto de seu local de formação e rapidamente hidrolisadas após a liberação (MARCEAU e REGOLI, 2004). Tais peptídeos apresentam atividade vasodilatadora, estimulam nervos sensoriais simpáticos e estão envolvidos no controle da pressão arterial e da permeabilidade da BHE (MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013).

1.2.2. Mecanismos de síntese de cininas

As cininas são produzidas nos vasos sanguíneos e nos tecidos lesionados a partir de proteínas precursoras chamadas cininogênios, os quais são produzidos pelo fígado e podem ser de dois tipos: cininogênios de alto peso molecular (HK) ou cininogênios de baixo peso molecular (LK). A calicreína, uma serina protease que pode ser tecidual ou plasmática, é a responsável por liberar as cininas a partir da clivagem dos HK ou LK (MOREAU et al., 2005).

Nos mamíferos, existem duas grandes cascatas bioquímicas produtoras de cininas. O sistema gerador de cininas plasmático, também conhecido como sistema de contato é mais complexo e se inicia com a ativação da cascata da coagulação. A segunda é mais simples e envolve a calicreína tecidual (TK) e seu substrato é o LK (MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013).

1.2.2.1. Sistema de Contato

O sistema de contato é formado pelo HK e por 2 serina proteases: fator XII (FXII) da cascata da coagulação (também chamado fator Hageman) e a pré-caliceína plasmática. A caliceína plasmática (PK) é secretada pelos hepatócitos em uma forma inativa chamada pré-caliceína. Essa última circula no plasma como um heterodímero ligado ao HK (complexo PK-HK). A ligação do fator XII inativo a superfícies carregadas negativamente, como, por exemplo, membranas basais danificadas, leva à auto ativação do FXII (RAIDOO e BHOOLA, 1998). O FXII ativado, por sua vez, cliva a pré-caliceína liberando a caliceína ativa, que, então, libera a bradicinina a partir da clivagem do HK (KAPLAN et al., 1997). Uma segunda forma de ativação da pré-caliceína ocorre pela ligação do HK presente no complexo HK-PK à superfície de células endoteliais, leucócitos e plaquetas (MOTTA et al., 1998; LIN, PIXLEY e COLMAN, 2000; ZHAO et al., 2001).

1.2.2.2. Sistema Tecidual

Da mesma forma que a caliceína plasmática, a forma tecidual da enzima também é sintetizada na forma de pró-caliceína e, após a clivagem por ação de proteases, libera a TK ativa que, por sua vez, catalisa a produção de calidina a partir da clivagem do LK. As proteases capazes de clivar e ativar a pró-caliceína incluem metaloproteases, esterases (NODA, TAKADA e ERDOS, 1985; KAMADA et al., 1990) e a plasmina, protease responsável por quebrar a rede fibrina. A TK é amplamente distribuída nos rins, vasos sanguíneos, SNC, pâncreas, glândulas salivares, adrenais, neutrófilos, intestino, entre outros, e sua ativação ocorre tanto em condições saudáveis quanto em processos de lesão tecidual e inflamação (MOREAU et al., 2005). Embora o LK seja considerado o principal substrato da TK sabe-se que ela também é capaz de clivar o HK para liberar bradicinina (MOREAU et al., 2005).

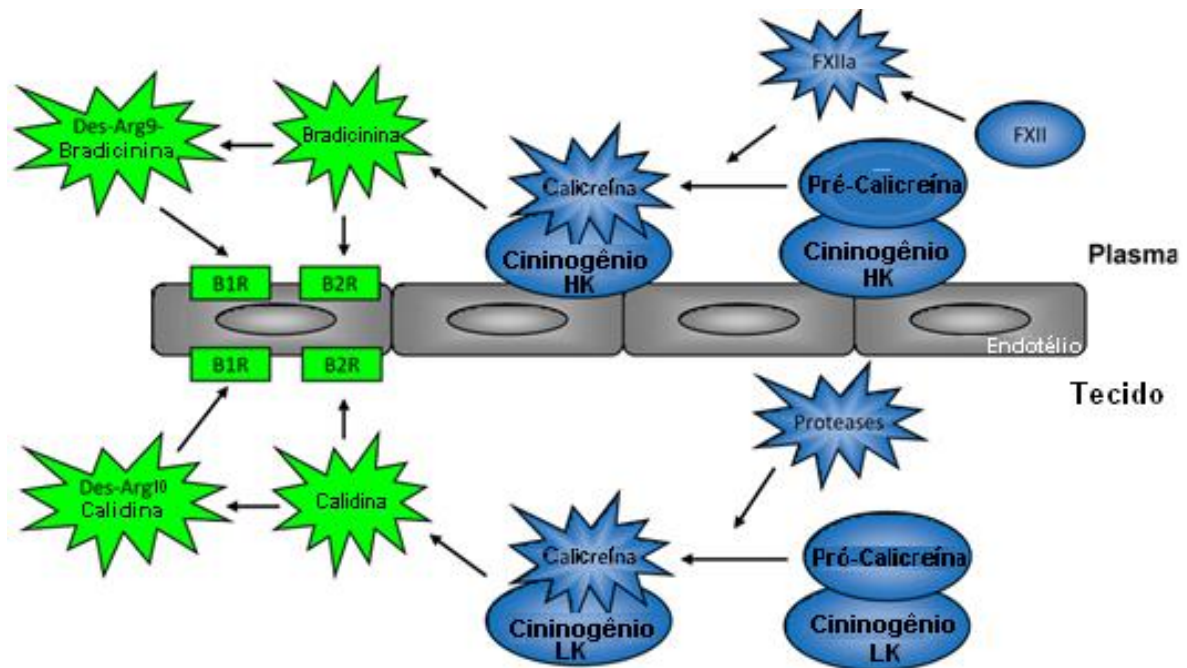


Figura 5 - As duas principais rotas formadoras de cininas (bradicinina e calidina) - O quadro superior esquematiza a ativação por contato enquanto o quadro inferior demonstra a cascata de ativação tecidual. Adaptada de ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ (2013).

1.2.3. Degradação das cininas

A degradação das cininas é realizada rapidamente por dois tipos de peptidases conhecidas como cininases (ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013). As cininases I incluem as carboxipeptidases N e M que são zinco metaloproteases. Elas clivam peptídeos contendo Arg ou Lys nas extremidades carboxi terminais, transformando a BK e a KD em des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-KD, respectivamente. Ambos os metabólitos são cininas ativas com ligação preferencial pelo receptor B₁ (SKIDGEL, 1988; MOREAU et al., 2005). A enzima conversora da angiotensina (ECA) é a cininase II que é capaz de degradar tanto a BK e KD quanto os seus metabólitos ativos. Assim, a ECA é considerada a maior enzima inativadora de cininas (ERDOS, 1990; JASPARD, WEI e ALHENC-GELAS, 1993). A figura 5 demonstra esquematicamente as duas principais formas de ativação do sistema caliceína-cininas, bem como seu metabolismo e interação com seus receptores B₁ e B₂.

1.2.4. Receptores de cininas

Dois tipos de receptores acoplados a proteína G medeiam os efeitos fisiológicos das cininas, são eles: os receptores B₁ (B₁R) e os receptores B₂ (B₂R) (MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013). Enquanto as cininas nativas (BK e KD) têm alta afinidade pelos B₂R, os seus metabólitos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-KD ligam-se primariamente nos B₁R (MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013). Interessantemente, a PK (HECQUET et al., 2000; HECQUET et al., 2002) e o HK (KOLTE et al., 2011) também ativam diretamente os B₂R.

O B₂R é o principal responsável pelas ações fisiológicas das cininas. Esse receptor é comumente encontrado em tecidos saudáveis, particularmente em células endoteliais, células de músculo liso, fibroblastos, neurônios, astrócitos e neutrófilos (COUTURE et al., 2001). Sua expressão pode ser aumentada pela própria BK (PESQUERO et al., 1996) e também pela IL-1 β em uma rota que envolve prostanóides e proteína quinase A (PKA) (SCHMIDLIN et al., 1998).

Já o B₁R apresenta baixa expressão constitutiva, tendo sua expressão aumentada na presença de estímulos inflamatórios ou de lesões teciduais. A IL-1 β e o TNF- α e a própria BK são exemplos de mediadores inflamatórios indutores do B₁R (BASTIAN et al., 1998; PHAGOO, POOLE e LEEB-LUNDBERG, 1999; PHAGOO et al., 2000).

Além das diferenças citadas, os receptores B₁R e B₂R também divergem quanto à susceptibilidade à dessensibilização. Ao ser ativado por agonistas, o B₂R entra em um processo de internalização e endocitose seguido de extensiva reciclagem para a superfície celular (DE WEERD e LEEB-LUNDBERG, 1997). O B₁R, por sua vez, sofre dessensibilização em um grau muitíssimo reduzido (LEEBS-LUNDBERG et al., 2005).

1.2.4.1. Cascata de transdução de sinal dos receptores B₁ e B₂

Os receptores B₁ B₂ são receptores de 7 domínios transmembrana acoplados à proteína G inibitória (Gi) e à proteína G acoplada a fosfolipase C (Gq) (CALIXTO et al., 2004; MOREAU et al., 2005). A ativação da proteína Gq ativa a fosfolipase C, propiciando a

liberação do Ca^{++} do retículo endoplasmático, e à translocação da proteína quinase C (PKC) para a membrana. O aumento do Ca^{++} desencadeia a ativação da eNOS, da nNOS e da fosfolipase A_2 (ALBERT-WEISSENBERGER et al., 2012). Há também um aumento na produção de ácido araquidônico (LAL et al., 1997; XING, TAO e INSEL, 1997) e, conseqüentemente, uma maior síntese de PGs (CALIXTO et al., 2000). O NO e as PGs (especialmente a prostaciclina) são os responsáveis pelo mais conhecido efeito das cininas, a vasodilatação. Isso é possível porque ambos os mediadores promovem o aumento do conteúdo de guanosina monofosfato cíclica e adenosina monofosfato cíclica (AMPc), moléculas conhecidamente vasodilatadoras (MARCEAU e REGOLI, 2004; MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013). A ativação do B_2R também pode promover fosforilação transitória de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK)s especificamente a quinase regulada por sinal extracelular (ERK)1/2 e a p38 (SABATINI et al., 2013). Outros estudos mostram que ativação dessa rota pelo B_2R também é capaz de ativar o NF- κB (PAN et al., 1998; CHEN et al., 2004; BRECHTER e LERNER, 2007; LEE et al., 2008).

O B_1R também interage diretamente com Gq e proteínas Gi e recruta essencialmente as mesmas vias de sinalização do B_2R (ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013; SABATINI et al., 2013). Entretanto, os padrões de sinalização são diferentes em termos de concentração e de duração e intensidade da resposta, que parecem ser maiores nos B_1R (MOREAU et al., 2005; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013).

1.2.5. Sistema Calicreína-cininas no TCE

Todos os componentes do calicreína-cininas estão presentes no tecido cerebral. A TK é encontrada em várias regiões cerebrais, estando expressa nas proximidades dos vasos sanguíneos (KITAGAWA et al., 1991). A expressão do B_1R é baixa em condições normais, mas é rapidamente aumentada durante a neuroinflamação. O B_2R , no entanto, é constitutivamente expresso em neurônios (RAIDOO et al., 1996; GROGER et al., 2005), astrócitos (CHOLEWINSKI et al., 1991; JEFTINIJA et al., 1996), micróglia (NODA et al., 2003), oligodendrócitos (KASTRITSIS e MCCARTHY, 1993) e células endoteliais (WAHL

et al., 1993; WAHL et al., 1996; WAHL et al., 1999; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013).

Acredita-se que após uma lesão tecidual (traumática ou isquêmica), as cininas sejam os primeiros mediadores inflamatórios gerados no local da lesão (WALKER, PERKINS e DRAY, 1995). Isso porque as células destruídas liberam enzimas lisossomais que podem liberar a BK e a KD de seus respectivos cininogênios (THORNTON et al., 2010). Além disso, o extravasamento de plasma e sangue para o tecido lesado ativa o fator XII da cascata da coagulação dando início a geração de cininas pelo sistema de contato (FRANCEL, 1992).

De fato, a literatura mostra que, no hemisfério ipsilateral de ratos submetidos ao PFL, os níveis de cininogênios encontram-se significativamente aumentados de 1 até 15 horas após a lesão (ELLIS, CHAO e HEIZER, 1989). Em camundongos, as cininas acumulam-se no tecido cerebral a partir de 2 horas após o TCE (TRABOLD et al., 2010). Esses achados estão de acordo com estudos realizados em humanos que demonstram aumento nos níveis de cininas no plasma e no líquido nas primeiras 72 horas após o trauma (SUGIMOTO et al., 1998; MARMAROU, A. et al., 2005; KUNZ et al., 2013)

Sabe-se que as cininas geradas após a lesão estimulam os receptores B_2 em células endoteliais e astrócitos, aumentando assim a permeabilidade da BHE (THORNTON et al., 2010; ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013). De fato, a literatura demonstra que a ativação do B_2R em astrócitos medeia a secreção da IL-6, (SCHWANINGER et al., 1999) o aumento do conteúdo de Ca^{++} intracelular e consequentemente a síntese de PGs, NO e a expressão de metaloproteinases (HSIEH et al., 2004; HSIEH et al., 2007; YANG et al., 2013). Ademais, estudos do grupo de Papura revelam que a BK, através do B_2R estimula a liberação de aminoácidos excitatórios de astrócitos (PARPURA et al., 1994; LIU et al., 2009) e de células de Schwann (PARPURA et al., 1995; JEFTINIJA et al., 1996). A BK sabidamente também causa a degranulação de mastócitos resultando na liberação de outras substâncias vasoativas como a histamina, serotonina e substância P. Além disso, o aumento de Ca^{++} e de AMPc e nas células endoteliais, mediado pelo B_2R , parece estar envolvido na abertura das “*tight junctions*” (HE, ZHANG e CURRY, 1996; HE, ZENG e CURRY, 2000). Tais ações explicam o envolvimento das cininas na abertura da BHE que ocorre após o TCE e são esquematicamente resumidas na figura 6.

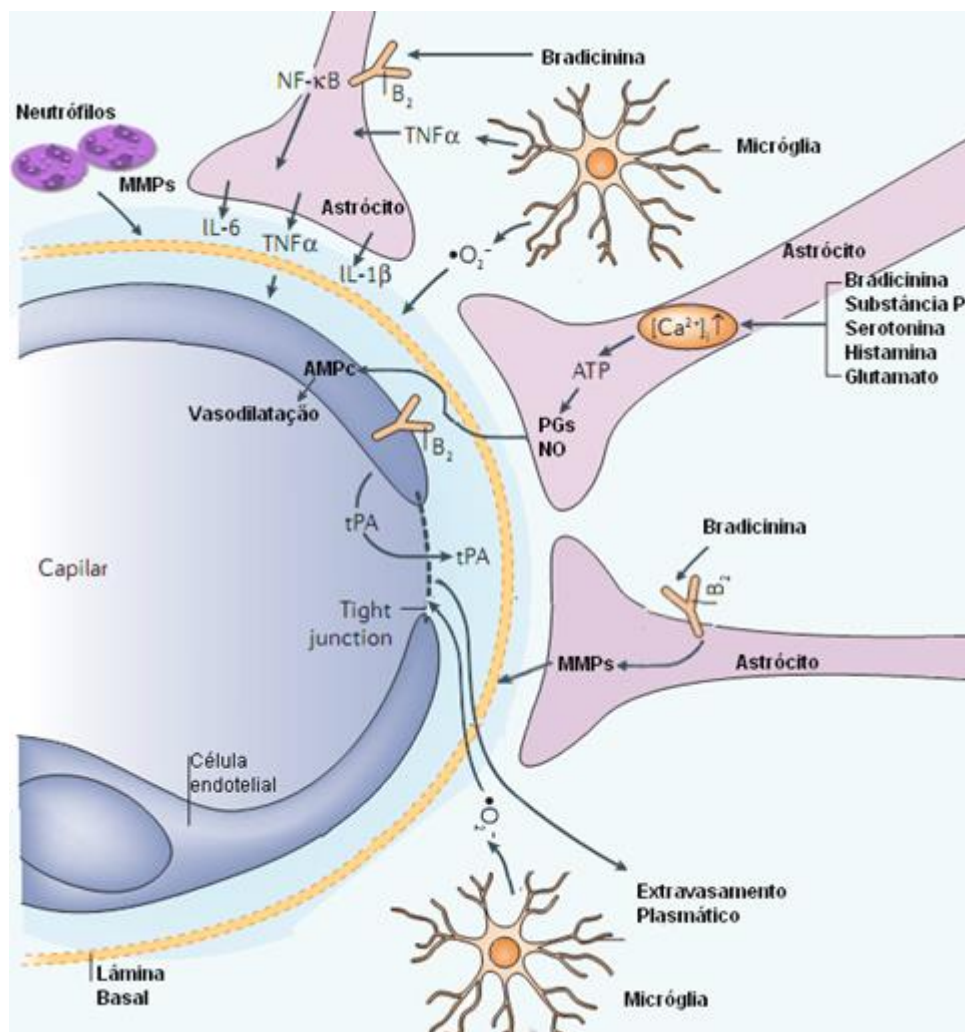


Figura 6 – Representação esquemática do envolvimento das cininas na abertura da barreira hematoencefálica. Ativação do B_2R em astrócitos medeia a secreção da IL-6, a síntese de PGs, NO, a expressão de MMPs e a abertura das “tight junctions”. O estímulo B_2R também causa a liberação de outras substâncias vasoativas como a histamina, serotonina e substância P. Adaptada de ABBOTT, RONNBACK e HANSSON (2006).

A expressão e a função dos receptores de cininas também vêm sendo bastante avaliadas em estudos com modelos experimentais de TCE envolvendo bloqueio farmacológico e animais geneticamente modificados.

Interessantemente, o padrão de expressão dos receptores de cininas parece se modificar de acordo com o modelo de TCE experimental aplicado. Em modelos de trauma por ICC, o receptor B_1 tem sua expressão aumentada 6 horas após a lesão cerebral, enquanto o B_2R não apresenta significativo incremento em sua expressão (TRABOLD et al., 2010). HELLAL et al. (2003) demonstraram, em modelos de trauma por LCF, que ambos os receptores encontram-se aumentados 24 horas após a lesão. Entretanto, o grupo de ALBERT-WEISSENBERGER et al. (2012) evidenciou esse aumento apenas na expressão do B_1R 7 dias

após a lesão induzida por modelo de LCF. Já no TCE por lesão criogênica, o aumento na expressão do B₁R foi evidenciado somente nas primeiras 12 horas após o trauma, enquanto a indução do B₂R permaneceu elevada por até 48 horas em camundongos (RASLAN et al., 2010).

A literatura dispõe ainda de trabalhos indicando os benefícios do bloqueio dos receptores das cininas sobre o TCE experimental. Entretanto, os resultados são contraditórios no que diz respeito a qual receptor desempenha um papel benéfico e qual desempenha um papel maléfico nessa condição.

Vários estudos destacam o B₂R como um indutor do edema cerebral causado por diferentes modelos experimentais de TCE em camundongos e em ratos (STOVER, DOHSE e UNTERBERG, 2000; GORLACH et al., 2001; PLESNILA et al., 2001; HELLAL et al., 2003; KAPLANSKI et al., 2003; IVASHKOVA et al., 2006; TRABOLD et al., 2010). Além disso, a depleção genética ou a inibição farmacológica do B₂R apresenta efeitos protetores em vários outros aspectos do TCE experimental. Esses efeitos incluem:

- A) a redução da PIC (ZWECKBERGER e PLESNILA, 2009);
- B) a melhora sobre as disfunções neuromotoras agudas (HELLAL et al., 2003; KAPLANSKI et al., 2003; IVASHKOVA et al., 2006; TRABOLD et al., 2010);
- C) a redução da migração de neutrófilos (HELLAL et al., 2003);
- D) a menor indução da iNOS (HELLAL et al., 2003);
- E) a diminuição do volume de lesão cerebral induzida pelo trauma (GORLACH et al., 2001; ZWECKBERGER e PLESNILA, 2009; TRABOLD et al., 2010).

Contudo, outros dois estudos observaram apenas tendências não significativas de melhora no quadro do TCE, com a supressão farmacológica ou genética da função do receptor B₂ em camundongos. Porém, o bloqueio do B₁R mostrou ações protetivas sobre a atividade neuromotora, a astrogliose, o dano axonal (ALBERT-WEISSENBERGER et al., 2012), o volume de lesão, a abertura da BHE e sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias (RASLAN et al., 2010).

Os efeitos promissores dos antagonistas dos B₂R, principalmente em relação ao edema cerebral, e ao aumento da PIC, levaram alguns grupos a avaliar seus efeitos em estudos clínicos. Os resultados obtidos são conflitantes, enquanto alguns demonstram pequenas melhoras outros não a veem. No entanto, é preciso ter-se em mente que esses trabalhos ainda são poucos e que suas metodologias não são perfeitas (ALBERT-WEISSENBERGER, SIREN e KLEINSCHNITZ, 2013), demonstrando a necessidade de mais estudos clínicos e experimentais.

1.3. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTIDEO FOSFATO (NADPH)-OXIDASE

As cascatas que integram o dano secundário do TCE comumente alimentam as rotas produtoras de EROs. Devido ao alto consumo de oxigênio, ao abundante conteúdo de lipídeos sensíveis à oxidação e à restrita capacidade regenerativa dos neurônios, o SNC torna-se um órgão especialmente susceptível ao insulto oxidativo (ADIBHATLA e HATCHER, 2010). As EROs produzidas após o TCE frequentemente derivam da disfunção mitocondrial e de fontes enzimáticas que incluem a xantina oxidase, as ciclooxigenases, a mieloperoxidase e a NADPH-oxidase.

A NADPH-oxidase é um complexo multienzimático que catalisa a redução de oxigênio molecular a partir da oxidação do NADPH para gerar o radical $O_2^{\cdot-}$ ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BEDARD e KRAUSE, 2007; BROWN e GRIENGLING, 2009; SURACE e BLOCK, 2012). Duas de suas subunidades estão ligadas a membrana plasmática, a subunidade catalítica (chamada de NOX) e a $p22^{phox}$, enquanto as outras se encontram no citoplasma. Durante o processo de ativação, as subunidades citoplasmáticas unem-se à NOX iniciando o a geração de $O_2^{\cdot-}$.

Até o momento, se conhecem 7 tipos de NADPH-oxidase, cada uma contendo uma NOX diferente. São elas NOX1, NOX2 (também conhecida como $gp91^{phox}$), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2. Além dos diferentes componentes estruturais, as DUOX1 e 2 também diferem das demais por serem produtoras preferenciais de H_2O_2 (GEISZT et al., 2003; RADA e LETO, 2010; YOSHIHARA et al., 2012).

1.3.1. Função da NADPH-oxidase no sistema nervoso central

As diferentes isoformas da NADPH-oxidase são encontradas em todas as células do SNC (KAHLES e BRANDES, 2013). Estudos com roedores mostram que as isoformas contendo NOX 1, 2 e 4 são expressas em artérias cerebrais, estando presente no endotélio e musculatura lisa (KAHLES e BRANDES, 2013). Essas mesmas isoformas são também

expressas em astrócitos (ABRAMOV et al., 2005; REINEHR et al., 2007), neurônios (COYOY et al., 2008) e micróglia (HARRIGAN et al., 2008).

Nesse contexto, funções fisiológicas para a NADPH-oxidase no SNC têm sido propostas por vários autores. A mais conhecida é a produção de O_2^- como substrato para a explosão respiratória, cuja principal função é destruir os microrganismos invasores fagocitados (KOBAYASHI, VOYICH e DELEO, 2003). Outra função descrita para NADPH-oxidase é modular a pressão arterial através da regulação da ação da angiotensina II (um peptídeo endógeno responsável pela regulação da homeostase cardiovascular e da pressão arterial) na vasculatura cerebral (WANG, G. et al., 2004). Estudos também indicam a participação da NADPH-oxidase na proliferação da micróglia (MANDER, JEKABSONE e BROWN, 2006), na apoptose neuronal induzida pela micróglia (MARIN-TEVA et al., 2004) e na liberação de glutamato por astrócitos ou pela micróglia (BARGER et al., 2007; HARRIGAN et al., 2008; LIU et al., 2009). Outra possível função fisiológica dessa enzima é a geração de EROs necessária para a sinalização intracelular envolvida nos eventos moleculares da formação da memória (KISHIDA e KLANN, 2007).

1.3.2. Mecanismo de ativação da NADPH-oxidase

Por ser o protótipo das enzimas NADPH-oxidase, a isoforma de fagócitos tem seu mecanismo de ativação amplamente estudado. Assim, o processo de ativação dessa enzima será descrito nesta tese como base para função da NADPH-oxidase de forma geral.

Em condições normais, a NOX2 (subunidade catalítica da isoforma de fagócitos) encontra-se inativa e associada a $p22^{phox}$ na membrana do fagossomo (lisossomo contendo inúmeras enzimas proteolíticas e enzimas produtoras de EROs usadas para digerir corpos estranhos). A partir de um estímulo externo, que pode ser um ligante de receptor, um microrganismo ou restos celulares, há a ativação de quinases como PKC, PKA e MAPK (p38 e ERK1/2). A partir de então, ocorre a fosforilação da subunidade $p47^{phox}$ (EL BENNA et al., 1996; JOHNSON et al., 1998; DEWAS et al., 2000; BEY et al., 2004) que gera uma mudança conformacional que permite a sua translocação para membrana e a associação da $p47^{phox}$ com $p22^{phox}$ (HEYWORTH et al., 1991; LEUSEN et al., 1994). Ao mesmo tempo em que ocorre essa associação, a $p67^{phox}$, que se encontra ligada a $p47^{phox}$, une-se a NOX2 ativando-a (NISIMOTO et al., 1999; HAN e LEE, 2000). Durante esse processo, há troca de um GDP

por um GTP em uma Rac GTPase (uma pequena proteína G). A formação do complexo $P22^{\text{phox}}$ - $P47^{\text{phox}}$ - $P67^{\text{phox}}$ - gera um sítio de ligação para a Rac GTPase ativada, cuja associação com o restante do complexo resulta na criação da enzima funcional (BROWN e GRIENGLING, 2009). A NADPH-oxidase ativa passa a catalisar a redução do oxigênio molecular à custa da oxidação do NADPH citoplasmático (BEDARD e KRAUSE, 2007). O $O_2^{\cdot-}$ produzido é, então, liberado no meio extracelular ou no interior do fagossomo (BEDARD e KRAUSE, 2007). No interior dessa organela, o $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido em outras espécies reativas potencialmente mais tóxicas como o H_2O_2 e $ONOO^-$ (KOBAYASHI, VOYICH e DELEO, 2003).

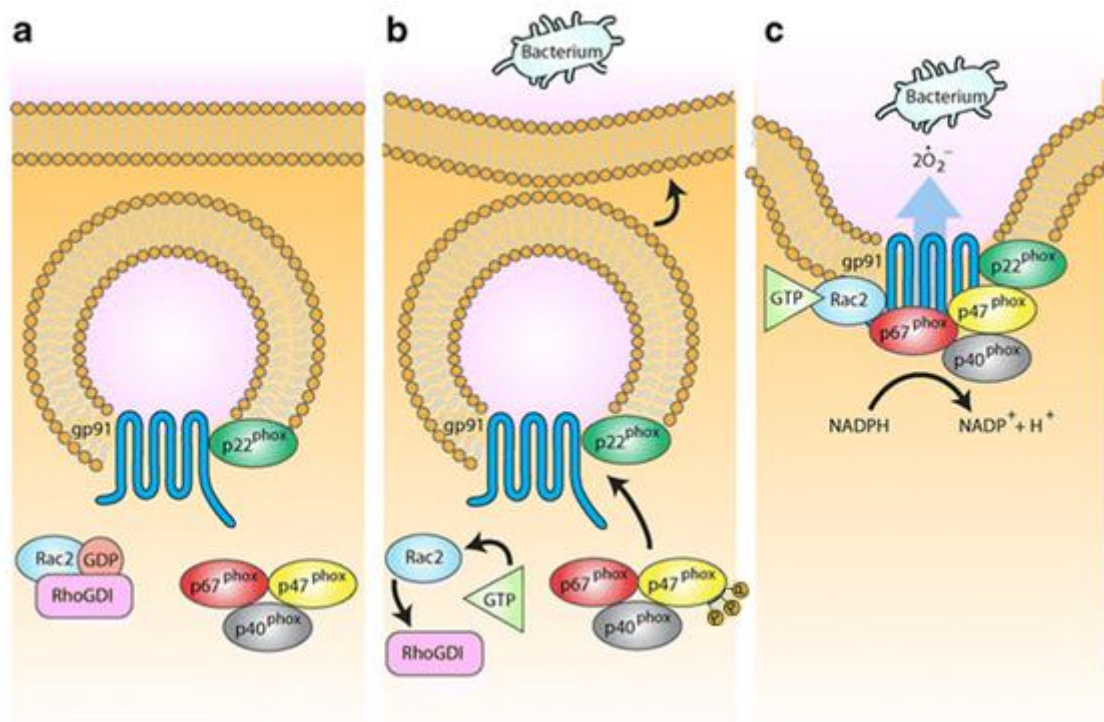


Figura 7 - Representação esquemática da ativação da NADPH-oxidase. **A)** Na enzima inativa, apenas a p22 e a NOX encontram-se na membrana. **B)** Após o estímulo externo, ocorre a fosforilação da p47 e a ativação da Rac GTPase que levam à associação de todas as subunidades na membrana do fagossomo. **C)** NADPH-oxidase unida e ativada produzindo superóxido a partir do NADPH. Adaptada de LAM, HUANG e BRUMELL (2010).

1.3.3. NADPH-oxidase e neurodegeneração

Baseado no grande potencial produtor de EROs da NADPH-oxidase, recentes revisões (GAO, ZHOU e HONG, 2012; SURACE e BLOCK, 2012) propõem um papel essencial para ativação da enzima de fagócitos na neuroinflamação e no estresse oxidativo associados à neurodegeneração.

De fato, existem duas formas pelas quais a atividade da NOX2 pode induzir neurotoxicidade. Uma delas é o excesso de produção de EROs, a outra é a sinalização intracelular mediada pelas EROs que permite o aumento da resposta inflamatória da micróglia e, conseqüentemente, a propagação da neurotoxicidade (SURACE e BLOCK, 2012).

A ativação dos PAMPS e DAMPs da micróglia parecem ser os responsáveis por transformar o sinal dado pelos agentes estressores em ativação da NOX2 dentro da micróglia. Assim, é através desses receptores que os patógenos, restos celulares e proteínas como a β -amiloide estimulam a translocação das subunidades reguladoras para membrana (LOANE e BYRNES, 2010).

Em condições patológicas, a NOX2 torna-se uma fonte crônica de $O_2^{\cdot-}$ (SURACE e BLOCK, 2012). O $O_2^{\cdot-}$ produzido por ela pode ser dismutado à H_2O_2 (MCCORD e FRIDOVICH, 1969). Esse agente oxidante é relativamente estável, mas está envolvido na modulação da atividade de quinases e fosfatases, sendo prejudicial apenas em concentrações supra-fisiológicas. Porém, quando combinado com o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 pode ser transformado em radical hidroxila (OH^*), em uma reação altamente acelerada pela presença de metais como ferro, na chamada reação de Fenton (CEDERBAUM, DICKER e COHEN, 1980; MOREHOUSE e MASON, 1988). Essas espécies reativas, produzidas em consequência da ativação da NOX2 ($O_2^{\cdot-}$, OH^* , H_2O_2), acumulam-se no fagossomo podendo alcançar concentrações superiores a 1M (HAMPTON, KETTLE e WINTERBOURN, 1998). Tais EROs vazam do interior da célula, danificando os tecidos circundantes (BROWN e NEHER, 2010; SUNDAR et al., 2010). Outra importante consequência da ativação da enzima de fagócitos é a produção de $ONOO^{\cdot-}$, (através da reação do NO com o $O_2^{\cdot-}$) que pode desencadear a apoptose neuronal (KUHN et al., 2004; BROWN e NEHER, 2010).

Considerando que a sobreposição da produção das EROs e ERNs à neutralização das mesmas causa a oxidação de lipídios proteínas e DNA, a NADPH-oxidase de fagócitos torna-se uma importante fonte de dano tecidual no SNC (INFANGER, SHARMA e DAVISSON, 2006). Estudos têm demonstrado que, além de induzir estresse oxidativo, a NOX2 está

envolvida na produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , PGE₂, IL-1 β e IL-6), na expressão da iNOS e na proliferação da micróglia (QIN et al., 2004; WANG, T. et al., 2004), (MANDER, JEKABSONE e BROWN, 2006; QIN et al., 2013). Além disso, (CHOI, S. H. et al., 2012) revelaram que a alta atividade da NOX2 pode estar associada ao estado pró-inflamatório clássico da micróglia e que a inibição dessa enzima passa a célula para um estado alternativo que amortece a resposta inflamatória e promove a reparação e cura de tecidos.

O mecanismo pelos qual as EROs modulam a resposta inflamatória inclui fosfatases que podem ser inibidas temporariamente pela oxidação de resíduos de cisteínas presentes em seus sítios redox sensíveis (CHIARUGI e CIRRI, 2003). Além disso, fatores de transcrição como o NF- κ B e o fator nuclear-2 (fator nuclear relacionado aos eritrócitos e receptores de glicocorticoides) e quinases como as MAPKs apresentam sítios de regulação redox (BODWELL, HOLBROOK e MUNCK, 1984; BLOOM, DHAKSHINAMOORTHY e JAISWAL, 2002; YANG et al., 2007; LEE et al., 2011).

A partir dos dados acima citados, alguns autores concluem que o excesso de atividade da NADPH-oxidase pode ser considerado uma fonte de dano em patologias do SNC como isquemia, TCE, doença de Parkinson e doenças Alzheimer (INFANGER, SHARMA e DAVISSON, 2006; GAO, ZHOU e HONG, 2012).

1.3.4. NADPH-oxidase e o TCE

A maior parte dos estudos envolvendo lesões cerebrais e a NADPH-oxidase avalia seu papel no dano causado por isquemia e reperfusão cerebral. Os dados disponíveis indicam que a isoforma da NADPH-oxidase contendo a NOX2 é a mais importante isoforma envolvida na lesão cerebral isquêmica (KAHLES e BRANDES, 2012).

Contudo, cinco trabalhos avaliaram, até o momento, a participação da NADPH-oxidase na propagação da lesão causada por TCE. Um desses estudos revelou um significativo aumento na atividade da enzima e na produção de O₂⁻ de 1-96 horas após a lesão por CCI (ZHANG et al., 2012) em camundongos. Outros trabalhos avaliaram a expressão da subunidade catalítica, NOX1 ou NOX2. O mais recente deles verificou uma elevação na expressão da NOX1 que se estendeu por até 8 dias após a lesão cerebral por ondas de choque em ratos (ABDUL-MUNEER et al., 2013). O outro estudo evidenciou um aumento no

conteúdo proteico da NOX2 em micrógliaS ativadas nas primeiras 24 horas a pós o CCI (DOHI et al., 2010) de camundongos.

Além disso, a deleção genética da subunidade gp91^{phox} parece reduzir a área de lesão e número de células apoptóticas (DOHI et al., 2010), bem como atenuar o prejuízo motor (LO et al., 2007) em diferentes modelos de TCE experimental. Já a inibição farmacológica da enzima tem sido avaliada com o uso da apocinina (40-Hydroxi-30-metoxiacetofenona).

A apocinina é uma droga originalmente isolada de uma planta medicinal chamada *Picrorhiza kurroa*. Atualmente, ela é obtida comercialmente, apresenta baixo custo e pouca toxicidade. Estudos com esse fitoquímico mostram que ele parece atuar como uma pró-droga, uma vez que tem de ser oxidada, à sua forma dimérica, a diapocinina, que é supostamente a forma ativa de apocinina (STOLK et al., 1994; JOHNSON et al., 2002). PETRONIO et al. (2013) mostraram ainda que apocinina liga-se significativamente a albumina sérica e que tem facilidade para adentrar em membranas celulares

Trabalhos realizados em modelos experimentais revelam que a apocinina é considerada como um dos fármacos mais promissores para o tratamento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas, nas quais há o envolvimento das EROs (GHOSH et al., 2012; LI, J. et al., 2013; LI, M. et al., 2013; LIU et al., 2013), embora, um trabalho recente tenha demonstrado que esse fármaco apresenta baixa atividade antioxidante por si só (PETRONIO et al., 2013). Estudos demonstram que a apocinina age como um inibidor não específico da NADPH-oxidase (STOLK et al., 1994). Contudo, existem evidências indicando que essa molécula exerce seus efeitos predominantemente sobre a isoforma que contem a NOX2 (JAQUET et al., 2009). O mecanismo de ação dessa substância parece envolver a inibição da translocação da p47 e p67 para membrana (STOLK et al., 1994; CHOI, B. Y. et al., 2012).

Os estudos envolvendo esse fármaco e o TCE foram realizados em ratos e camundongos. Os resultados desses trabalhos indicam efeitos benéficos sobre: a produção de EROs; a lipoperoxidação; o dano oxidativo ao DNA; a ativação da micróglia; a disfunção da BHE; a deposição β -amiloide; e a morte neuronal induzidas por dois modelos de TCE experimental (ICC e LCF) (CHOI, B. Y. et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

1.3.5. Bradicinina, produção de EROs e atividade da NADPH-oxidase

Embora uma ligação entre bradicinina e a atividade NADPH-oxidase ainda não tenha sido estudada em modelos de TCE, a literatura evidencia uma ação estimulatória da BK sobre a atividade dessa enzima em culturas celulares.

Em culturas de astrócitos, estudos demonstram que a ativação do receptor B₂ desencadeia a produção de EROs em consequência da ativação da NADPH-oxidase (LIU et al., 2009; HSIEH et al., 2010; AKITA e OKADA, 2011; LIN et al., 2012). O efeito da BK sobre a NADPH-oxidase parece estar envolvido na liberação de glutamato (LIU et al., 2009); na ativação das MAPKs e do NF-κB (HSIEH et al., 2010) e no aumento da expressão das MMP-9 (LIN et al., 2012) e da heme oxigenase (HSIEH et al., 2010; YANG et al., 2013). Um trabalho deste ano revelou ainda que a BK é capaz de induzir morte celular de neurônios por meio da ativação do B₂R, em um efeito que pôde ser revertido com a adição do antioxidante N-acetilcisteína (YANG et al., 2013).

Além disso, ação da BK sobre atividade da NADPH-oxidase e a produção de EROs já foi demonstrada em outros tipos celulares. Em artérias coronárias humanas, a estimulação com BK induz vasodilatação dependente da atividade da NADPH-oxidase (LARSEN et al., 2009). Em células de músculo liso vascular de roedores, a BK induz a ativação da ERK-1/2 via produção de O₂⁻ derivada da NADPH-oxidase (GREENE, VELARDE e JAFFA, 2000; VELARDE et al., 2004). Na isquemia renal, o antagonismo do B₂R foi capaz de reduzir a produção de EROs e a morte celular (CHIANG et al., 2006). Em macrófagos de porcos da Índia, a BK também aumentou a produção de O₂⁻ via B₂R (BOCKMANN e PAEGELOW, 2000). O mecanismo pelo qual a bradicinina ativa a NADPH-oxidase parece envolver o aumento de Ca⁺⁺ intracelular e a ativação da PKC (WOODFIN et al., 2011) VELARDE et al., 2004; LIN et al., 2012).

Embora a importância do sistema caliceína-cininas e da atividade da NADPH oxidase na neuroinflamação desencadeada pelo TCE estejam bem estabelecidas, poucos trabalhos têm avaliado seus efeitos no desenvolvimento do déficit cognitivo pós-traumático. Sabe-se, também, que o bloqueio da ação dos principais mediadores inflamatórios parece diminuir déficits neuromotores e cognitivos. Assim, agentes que consigam diminuir a neuroinflamação podem exercer efeitos positivos sobre o déficit de memória causado pelo trauma. Além disso, a literatura corrente mostra uma interconexão entre os sistemas citados, em astrócitos, levantando a possibilidade de interconexão dos mesmos também no TCE.

Levando em conta os fatos citados acima e o crescente número de pessoas incapacitadas em decorrência do traumatismo craniano, torna-se pertinente a avaliação da participação dos receptores das cininas e da atividade da NADPH-oxidase no desenvolvimento dos déficits cognitivos e neuromotores, bem como de seus efeitos na neuroinflamação e estresse oxidativo causados pelo TCE experimental em camundongos.

2.1. OBJETIVOS GERAIS

2.1.1. Capítulo I:

Avaliar o efeito de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ das cininas nas alterações bioquímicas, motoras e cognitivas associadas ao TCE moderado induzido por PFL em camundongos.

2.1.2. Capítulo II:

Avaliar o efeito de um inibidor da enzima NADPH-oxidase nas alterações bioquímicas, motoras e cognitivas associadas ao TCE moderado induzido por PFL em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Capítulo 1:

A) Determinar o decurso temporal das disfunções motoras e cognitivas causadas pelo TCE moderado induzido por PFL em camundongos durante o período de 7 dias após a lesão;

B) Determinar a melhor janela temporal para o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ das cininas, por meio da dosagem do conteúdo de cininas em córtex cerebral de camundongos submetidos ao TCE moderado induzido por PFL durante o período de 7 dias após a lesão;

C) Avaliar o efeito de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ das cininas sobre o déficit motor e cognitivo causado pelo TCE moderado induzido por PFL;

D) Avaliar o efeito do antagonista com ação protetora sobre alterações comportamentais na neuroinflamação (IL-1 β , TNF- α , NO e edema) causada pelo TCE moderado induzido por PFL;

E) Avaliar o efeito do TCE moderado induzido por PFL e do antagonista com ação protetora sobre alterações comportamentais na a atividade da NADPH-oxidase;

F) Avaliar o efeito do antagonista com ação protetora sobre alterações comportamentais no estresse oxidativo (conteúdo de proteínas carboniladas, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS - e atividade da Na⁺, K⁺ ATPase) causado pelo TCE moderado induzido por PFL;

G) Avaliar o efeito do antagonista com ação protetora sobre alterações comportamentais na progressão da lesão cortical (volume de lesão) causada pelo TCE moderado induzido por PFL.

2.2.2. Capítulo II:

A) Determinar o efeito da apocinina nos déficits motor e cognitivo causados pelo TCE moderado induzido por PFL;

B) Determinar o efeito da apocinina na neuroinflamação (liberação de IL-1 β , TNF- α , NO e formação de edema) causada pelo TCE moderado induzido por PFL;

C) Determinar o efeito da apocinina no dano oxidativo (conteúdo de proteínas carboniladas, TBARS, e inibição da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase) causado pelo TCE moderado induzido por PFL;

D) Determinar o efeito da apocinina na progressão da lesão cortical (volume de lesão) causada pelo TCE moderado induzido por PFL.

3.1. Capítulo I:

3.1.1. HOE-140 protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice.

AUTHOR'S PROOF!

JrnID 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology
DOI 10.1007/s00213-013-3336-x

ORIGINAL INVESTIGATION

HOE-140, an antagonist of B2 receptor, protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice**Ana Paula Oliveira Ferreira · Fernanda Silva Rodrigues · Iuri Domingues Della-Pace · Bibiana Castagna Mota · Sara Marchesan Oliveira · Camila de Campos Velho Gewehr · Franciane Bobinski · Clarissa Vasconcelos de Oliveira · Juliana Sperotto Brum · Mauro Schneider Oliveira · Ana Flavia Furian · Claudio Severo Lombardo de Barros · Adair Roberto Soares dos Santos · Juliano Ferreira · Michele Rechia Fighera · Luiz Fernando Freire Royes**Received: 20 May 2013 / Accepted: 14 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013**Abstract****Rationale** There are evidences indicating the role of kinins in pathophysiology of traumatic brain injury, but little is known about their action on memory deficits.**Objectives** Our aim was to establish the role of bradykinin receptors B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) on the behavioral, biochemical, and histologic features elicited by moderate lateral fluid percussion injury (mLFPI) in mice.**Methods** The role of kinin B₁ and B₂ receptors in brain damage, neuromotor, and cognitive deficits induced by mLFPI, was evaluated by means of subcutaneous injection of B₂R antagonist (HOE-140; 1 or 10 nmol/kg) or B₁R antagonist (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin (DAL-Bk; 1 or 10 nmol/kg) 30 min and 24 h after brain injury. Brain damage was evaluated

in the cortex, being considered as lesion volume, inflammatory, and oxidative damage. The open field and elevated plus maze tests were performed to exclude the nonspecific effects on object recognition memory test.

Results Our data revealed that HOE-140 (10 nmol/kg) protected against memory impairment. This treatment attenuated the brain edema, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and nitric oxide metabolites content elicited by mLFPI. Accordingly, HOE-140 administration protected against the increase of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity, thiobarbituric-acid-reactive species, protein carbonylation generation, and Na⁺ K⁺ ATPase inhibition induced by trauma. Histologic analysis showed that HOE-140 reduced lesion volume when analyzed 7 days after brain injury.A. P. O. Ferreira · F. S. Rodrigues · I. D. Della-Pace · B. C. Mota · M. R. Fighera · 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 (UFSM),
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil
e-mail: nandoroyes@yahoo.com.brA. P. O. Ferreira · F. S. Rodrigues · I. D. Della-Pace · B. C. Mota · S. M. Oliveira · C. de Campos Velho Gewehr · 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, BrasilF. Bobinski · A. R. S. dos Santos
Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
Florianópolis, SC, BrasilC. V. de Oliveira · M. S. Oliveira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, BrasilJ. S. Brum · C. S. L. de Barros
Departamento de Patologia, Centro de Ciências Rurais,
Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, BrasilA. F. Furian
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, BrasilM. R. Fighera
Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brasil

Conclusions This study suggests the involvement of the B₂ receptor in memory deficits and brain damage caused by mLFPI in mice.

Keywords Traumatic brain injury · Bradykinin · Inflammation · Object recognition task · Oxidative stress

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a devastating disease frequently followed by significant behavioral disabilities and long-term medical complications that include permanent cognitive disorders, learning disabilities, and a wide range of behavioral and emotional problems (Sosin et al. 1995; Zink 2001; Bay and Covassin 2012). This condition is characterized by a combination of immediate mechanical dysfunction of brain tissue and secondary damage developed over a period of hours to days after injury. The secondary damage consists of neurochemical and physiological events that include the neuroinflammatory cascade, increased excitatory amino acid levels, free radical generation, and loss of ionic equilibrium and consequently delayed neuronal dysfunction and cell death (Werner and Engelhard 2007).

In the central nervous system (CNS), the kallikrein–kinin system is one of the first inflammatory pathways activated after tissue injury (Chao et al. 1983). This system constitutes a framework of serially connected serine proteases and peptides, namely coagulation factor XII, kininogen, and plasma kallikrein (Raidoo and Bhoola 1998; Moreau et al. 2005). It is important to note that all components of the kallikrein–kinin system have been identified in the brain and kinins (bradykinin and kallidin) constitute the end products of this enzymatic cascade (Raidoo and Bhoola 1998). The kinins exert their cellular effects through two subtypes of 7-transmembrane G-protein coupled receptors, the B₁ receptor (B₁R) and the B₂ receptor (B₂R) (Moreau et al. 2005). While the B₂R receptor is constitutively expressed in many cell types and mediates the physiologic effects of bradykinin, the B₁R receptor is induced after tissue damage (Hall 1992; Moreau et al. 2005). After activation, both B₁R and B₂R trigger classical inflammatory cascades such cytokine release, immune cell invasion, and increased vascular permeability (Marceau and Regoli 2004).

Although it has been well established that the Kallikrein–kinin system has a critical role in TBI, the role of B₁R and B₂R receptors in the pathophysiology of TBI disorders is not completely defined. While some authors have suggested the importance of B₂R rather than B₁R in the pathophysiology of TBI (Gorlach et al. 2001; Plesnila et al. 2001; Hellal et al. 2003; Trabold et al. 2010), others have demonstrated that antagonism of B₁R, but not B₂R, improves neurological

outcome after TBI since it reduces axonal damage, astroglia activation (Albert-Weissenberger et al. 2012), BBB disruption, and tissue inflammation (Raslan et al. 2010).

Considering that the direct involvement of kinins in cognitive deficits and brain damage induced by TBI have not yet been established, we investigated in parallel, the blockade of the B₁R and B₂R on the development of secondary damage characterized by inflammatory processes, oxidative stress generation, neurodegeneration, and functional outcome induced by the moderate lateral fluid percussion injury (mLFPI) model in mice.

Materials and methods

Subjects and maintenance

Male Swiss mice (28–32 g) provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria, were maintained in a room with a controlled temperature (24 ± 1 °C), 12 h light/dark cycle (lights on at 6:00), and standard laboratory chow and tap water ad libitum.

Experimental design

Initially, animals were submitted to TBI by mLFPI as described below. In order to determine the temporal profile of bradykinin release and cognitive and neuromotor functions, the mice were analyzed in five different time points (3 h, 6 h and 1, 3, and 7 days after trauma) as described in Fig. 1a.

To determinate the role of kinin B₁ and B₂ receptors of kinins in the neuromotor and cognitive deficits induced by mLFPI, the animals were injected subcutaneously (s.c.) with phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM) or B₂R antagonist (HOE-140; 1 or 10 nmol/kg) or B₁R antagonist (des-Arg9-[Leu8]-bradykinin (DAL-Bk; 1 or 10 nmol/kg) 30 min and 24 h after injury and the behavioral and histological analysis were performed as described in Fig. 1b.

In order to determine whether the treatment effective against memory deficit also protects against biochemical alterations induced by mLFPI, the animals were injected s.c. with PBS (50 mM) or B₂R antagonist (HOE-140; 10 nmol/kg) 30 min and 24 h after injury and biochemical analysis were performed as described in Fig. 1c.

Traumatic brain injury

The moderate lateral fluid percussion injury (mLFPI) was performed according to Carbonell et al. (1998) with slight modifications. Briefly, mice were anesthetized with a xylazine (10 mg/kg)/ketamine (100 mg/kg) mixture and placed in a stereotaxic head holder. The scalp was reflected and the skull exposed by means of a midline incision. A topical anesthetic

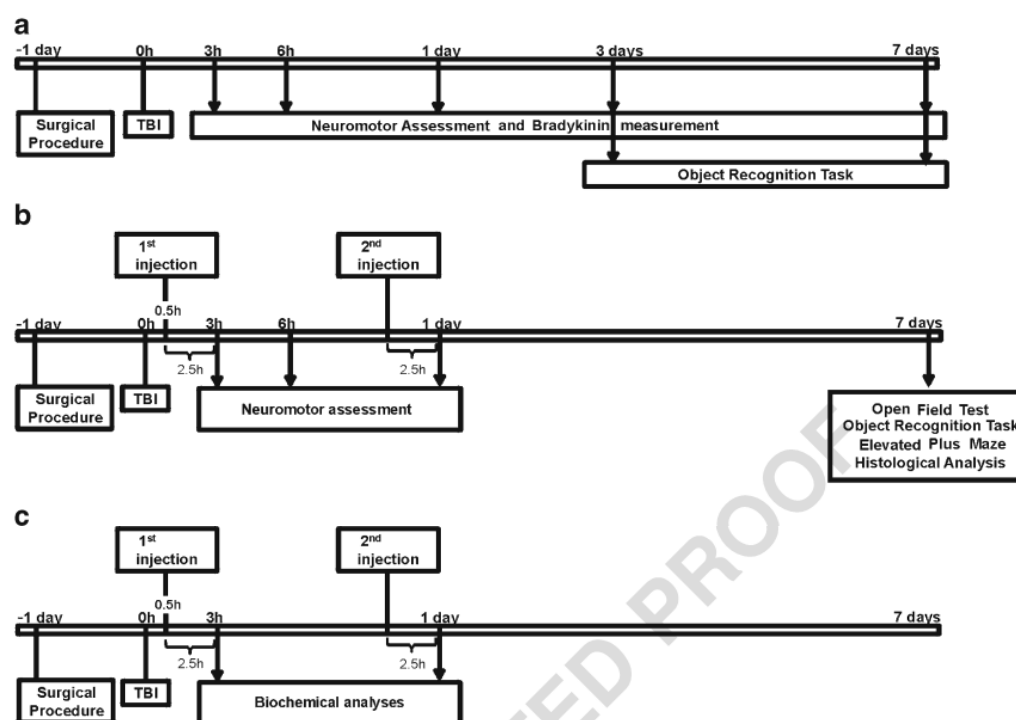


Fig. 1 Schematic representation of the study protocols. Protocol for determination of temporal profile of behavioral alterations and bradykinin release (a). Protocol for determination of HOE-140 and DAL-BK effects on neuromotor impairment, memory deficit, and lesion volume induced

by mLFPI (b). Protocol for determination of HOE-140 (10 nmol/kg) effects on biochemical alterations induced by mLFPI 3 h and 1 day after injury (c). All behavioral and biochemical analysis were performed 2.5 h after the drug administration

2 % lidocaine hydrochloride was applied to the skull and the fascia was scraped from the skull. A burr hole of 3 mm in diameter was drilled in the right parietal bone between bregma and lambda and between the sagittal suture and lateral ridge over the right hemisphere, taking care to keep the dura mater intact. A plastic cannula was placed over the craniotomy, and secured with dental cement. When the dental cement hardened the cannula was filled with 4 % chloramphenicol and closed with a proper plastic cap. Twenty-four hours after the surgical procedure, the animals were anesthetized with isoflurane, the injury cannula was attached to the fluid percussion device, and they were placed in a heat pad maintained at 37 ± 0.2 °C. All animals received ceftriaxone (200 mg/kg, i.p.) immediately after surgery and after trauma. TBI was produced by a fluid-percussion device developed in our laboratory. A brief (10–15 ms) transient pressure fluid pulse (1.7 ± 0.56 atm) impact was applied against the exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (hydraulic fluid control, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Tektronix TDS 210). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of mLFPI. Immediately after these procedures, the top of the cannula was sealed with dental cement.

Assessment of neuromotor function

Neuromotor function was tested by the neuroscore test as described by Raghupathi et al. (1998). Briefly, animals were subjected to a grid-walk test for 1 min in order to perform an assessment of the number of foot-faults. Subsequently, forelimb and hindlimb functions were evaluated by suspending the animals by the tail and observing how the animals grasped the top of the cage when they were lowered toward it (for the forelimbs), and the same pattern of spread and hindlimb extension during the suspension (for hindlimbs). Finally, animals were tested for both right and left resistance to lateral pulsion. Animals were awarded scores from 0 (severely impaired) to 4 (normal) for each of the following indices: forelimb function, hind-limb function and resistance to lateral pulsion. The maximum score for each animal was 12. Neurological motor function was evaluated by an experienced investigator who was blinded to all groups.

Evaluation of object recognition task and elevated plus maze

The objects to be discriminated were figures of similar size and texture (8–10 cm high). The objects were selected on the

basis of previous observations, which demonstrated a lack of preferential exploration of one object (A) over the other (B) [exploration of A in seconds was 16.6 ± 3.44 and exploration of B was 16.8 ± 4.09 ; $t(10) = 0.159$; $p > 0.05$]. To avoid olfactory stimuli, the objects to be discriminated were initially carefully cleaned and washed with ethanol solution (30 % in water) after each individual session. The testing arena was a plastic box (width, 20 cm; length, 30 cm; height, 15 cm, with the floor divided into 24 squares measuring 5×5 cm each) that was dimly lit so that the environment was visually uniform. Twenty-four hours before testing, the mice were allowed to explore the testing box for 10 min to reduce neophobic responses and habituate them to the stimuli present in the empty arena. During this time, an observer, who was not aware of pharmacological treatments, manually recorded the number of crossing and rearing responses. In the first trial two identical objects were placed in the box. Mice were put into the box for 5 min and exploratory activity was manually recorded. After a delay of 4 h, mice were re-introduced for 5 min, to the same cage in which one of the objects had been replaced by a new one. The cumulative time the mouse spent at each of the objects was manually recorded by an observer, who was not aware of pharmacological treatments. Exploration of an object was defined as follows: directing the nose to the object or touching it with the nose; turning around or sitting on the object was not considered as exploratory behavior. The percentage of the total exploration time the animal spent investigating the novel object was the measure of recognition memory, defined at the Discrimination Index (DI). It was calculated using the following formula: $(\text{time spent in investigating the new object}) - (\text{time spent in investigating the known object}) / \text{time spent in investigating both objects} * 100$.

In order to exclude the nonspecific effects of anxiogenic-like behavior on the memory test, the same set of animals was subjected to the elevated plus-maze task immediately after the object recognition task (ORT) test. The elevated plus-maze apparatus comprises two open arms (25×5 cm) across from each other and perpendicular to two closed arms ($25 \times 5 \times 15$ cm) with a center platform (5×5 cm). The apparatus is made of wood, the platform is white, and the walls are transparent acrylic. The entire apparatus is situated 50 cm above the floor. Initially, subjects were placed on the center platform of the maze facing an enclosed arm. During the test the mice were allowed to move freely about the maze for 10 min. The percentage of entries into each arm, the percentage of time spent in each arm, and the percentage of time spent in central platform were recorded and these measurements served as an index of anxiety-like behavior, as described by Komada et al. (2008). After each trial, all arms and the center area are cleaned with 30 % ethanol solution, to prevent bias based on olfactory cues.

Bradykinin immunoassay

Immediately after assessment of the motor function test and/or ORT, the animals were euthanized and the ipsilateral cortex was quickly dissected on ice-cold plate to evaluate the kinin content. The kinin content was determined in the ipsilateral cortex homogenized in a solution containing bovine serum albumin (10 mg/ml), 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, and 0.2 mM PMSF in PBS (0.1 M, pH 7.4). The concentrations of bradykinin-related peptides were measured using a commercially available ELISA Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer's protocol. The total protein concentration in the samples was determined according to the Bradford method (Bradford 1976) and the concentration of bradykinin-related peptides was normalized by the protein concentration contained in the samples. The results are expressed in picograms of kinins per milligram of protein.

Cytokine immunoassay

The interleukin (L- 1β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) content were determined in the ipsilateral cortex homogenate containing bovine serum albumin (10 mg/ml), 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, and 0.2 mM PMSF in PBS (0.1 M, pH 7.4). Cytokine levels were measured using a commercially available ELISA kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer's protocol. The concentration of cytokines was normalized by the protein concentration contained in the samples. Results are expressed in picograms per milligram of protein.

Measurement NADPH oxidase activity

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) activity was measured according to Thannickal and Fanburg (1995), with slight modifications. An aliquot of ipsilateral cortex homogenate was centrifuged at $1,000 \times g$ at 4°C for 10 min and the resulting supernatant was used. NADPH oxidase activity was determined by monitoring NADPH consumption for 90 min at 37°C in the presence or absence of the inhibitor diphenyleneiodonium ($10 \mu\text{M}$).

Measurement of thiobarbituric-acid-reactive species

Thiobarbituric-acid-reactive species (TBARS) content was estimated by the method of Ohkawa et al. (1979). Briefly, the ipsilateral cortex homogenates containing BHT ($80 \mu\text{M}$) were incubated in medium containing $30 \mu\text{L}$ cortex homogenate, $20 \mu\text{L}$ of 8.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), $80 \mu\text{L}$ buffered acetic acid (500 mM, pH 3.4), and $150 \mu\text{L}$ of 0.8 % thiobarbituric acid. The mixture was made up to $400 \mu\text{L}$ with

AUTHOR'S PROOF!

JrnID 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology

type I ultrapure water and heated at 95 °C for 60 min in water bath using a glass ball as condenser. Absorbance of each sample was measured in the supernatant at 532 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer (Hitachi Instruments Incorporation, Schaumburg, IL, USA).

Measurement of protein carbonyl content

Total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995) and adapted for brain tissue by Schneider Oliveira et al. (2004). Briefly, ipsilateral cortex homogenates were adjusted to 759–800 µg of protein per milliliter in each sample and 500 µL aliquots were mixed with 0.1 ml 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.1 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark environment, 250 µL denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3 % SDS), 1 ml heptane (99.5 %), and 1 ml ethanol (99.8 %) were added sequentially and mixed under vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Afterwards, protein isolated from the interface was washed twice with 1 ml ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 500 µL ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank) and total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹, as described by Levine et al. (1990).

Assay of NO_x (NO₂ plus NO₃) as a marker of NO synthesis

For NO_x determination, an aliquot of 100 µL of ipsilateral cortex homogenates containing 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, and 0.2 mM PMSF in phosphate-buffered saline was added to acetonitrile (96 %, HPLC grade). Afterwards, the homogenate was centrifuged at 3,000×g for 30 min at 4 °C and the supernatant was separated for the analysis of the NO_x content as described by Miranda et al. (2001). The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M) for protein determination by the Bradford method and the NO_x concentration was normalized by the protein concentration contained in the samples. Results are expressed in nanomoles of NO_x per milligram of protein.

Na⁺, K⁺-ATPase activity measurement

Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured in the ipsilateral cortex according to Silva et al. (2013). Briefly, the reaction medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, and 50 µg protein in the presence or absence of ouabain (1 mM) to 350 µL final volume. The reaction was started by adding adenosine triphosphate (ATP) to 5 mM final concentration. After 30 min at 37 °C, reaction was stopped by adding

70 µL trichloroacetic acid (50 %). Appropriate controls were included in the assays for ATP non-enzymatic hydrolysis. The amount of inorganic phosphate released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow and the Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

Evaluation of brain edema by water content

To determine the ipsilateral water content, a subset of animals were euthanized 3 h and 1 day after trauma. The ipsilateral hemispheres were immediately removed. After obtaining wet weight (WW) of fresh brain, tissue samples were dried in a desiccating oven at 105 °C for 24 h and weighed again to obtain the dry weight (DW). Tissue water content (%) was calculated as (WW–DW)/WW×100, according Zweckberger et al. (2006).

Evaluation of the injured cortical volume

After elevated plus maze test, the mice were euthanized for histologic analysis. Under deep anesthesia (ketamine hydrochloride, 200 mg/kg, i.p.) they were transcardially perfused with 100 mL of heparinized saline (1,000 UI/ml) followed by 100 mL of formaldehyde (4 %) in PBS (0.1 M), then the brains were carefully removed from the skull. Lesion volume measurement was performed according Ziebell et al. (2011) with some modifications. Briefly, six sections from bregma levels 0.5 to 3 mm, spaced 500 µm apart, were stained with hematoxylin and eosin, and digitally photographed using a stereomicroscope (Olympus BX51) with a digital camera (Olympus DP25). The peripheries of the lesion were traced on each image according to Fig. 8b–e by a pathologist, using a microscope at ×4 magnification. The area of cortical lesion was calculated using a calibrated image analysis software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Volumes were calculated using the formula $\sum(A_n + A_{n+1}) \times d/2$ where A is the lesioned area in each section and d is the distance between sections.

Data analysis

Data are expressed as means ± SEM or median ± interquartile range. Data were analyzed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) or by non-parametric tests such as Kruskal–Wallis or Friedman tests depending on the experimental design. Post hoc analyses were carried out by the Newman–Keuls tests, or Dunn tests when appropriate, and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

mLFPI causes neuromotor impairment, memory deficit, and bradykinin increase

Figure 2a shows the temporal profile of neuromotor damage after TBI. The results showed that mLFPI caused neuromotor impairment at 3 h, 6 h, and 1 day [H(5)=28.24; $p < 0.0001$] after brain injury. The mLFPI also induced a deficit in object recognition memory [F(2,22)=6.078; $p < 0.01$] when analyzed 7 days after brain injury (Fig. 2b). To determine the best temporal window for anti-bradykinin intervention, we performed a temporal profile for Bradykinin content in the ipsilateral cortex. Statistical analysis revealed that mLFPI increased kinin levels [F(5,18)=3.030; $p < 0.05$] in the

time intervals of 3 h, 6 h, and 1 day after the traumatic injury (Fig. 2c).

HOE-140 and DAL-Bk had no effect on neuromotor deficit induced by mLFPI

Figures 3 and 4 demonstrate the effect of B₂R antagonist (HOE-140; 1 or 10 nmol/kg) or B₁R antagonist (des-Arg9-[Leu8]-bradykinin (DAL-Bk; 1 or 10 nmol/kg) on neuromotor behavior after mLFPI. The Friedman test revealed that mLFPI induced neuromotor damage over time [F(4)=11.86; $p < 0.001$; Fig. 3a], but DAL-Bk (at dosages of 1 or 10 nmol/kg; s.c.) did not reverse this effect (Fig. 3b–d). The analysis of Fig. 4 confirmed the detrimental effect of mLFPI [F(4)=11.05; $p < 0.001$] but HOE-140 (at dosages of 1 or 10 nmol/kg; s.c.) also did not reverse the neuromotor deficit (Fig. 4b–d).

HOE-140 but not DAL-Bk protects against ORT deficit induced by mLFPI

Statistical analysis revealed that mLFPI significantly reduced the DI [F(4,27)=17.07; $p < 0.001$; Fig. 5a] and that DAL-Bk did not alter mLFPI-induced memory deficit. On the other hand, DI reduction caused by trauma was significantly reversed by HOE-140 (10 nmol/kg; s.c.) [F(4,27)=6.814; $p < 0.001$; Fig. 5b). In order to exclude the exploratory disabilities or anxiogenic effect on ORT we performed the open-field test (Table 1) and the elevated plus maze (Table 2). Statistical analysis showed that mLFPI and/or HOE-140 administration had no effect on crossing [F(4,27)=0.0798; $p > 0.05$] and rearing responses [F(4,27)=0.158; $p > 0.05$]. Therefore, mLFPI and/or HOE-140 administration did not alter anxiogenic-like behavior (Table 2). No significant difference in percentages was found between tested groups as regards the following behaviors: time spent in open arms [F(4,27)=0.7596; $p > 0.05$]; number of entries into open arms [F(4,27)=0.2172; $p > 0.05$]; time spent in enclosed arms [F(4,27)=0.4042; $p > 0.05$]; number of entries into enclosed arms [F(4,27)=0.2174; $p > 0.05$]; and time spent in the central area [F(4,27)=0.3088; $p > 0.05$].

HOE-140 protect against acute inflammatory parameters induced by mLFPI

We investigated whether this same treatment that reverses the memory deficit also alters the mLFPI-induced inflammation in the ipsilateral cortex. The results showed that mLFPI induced an increase in ipsilateral levels of IL-1 β [F(1,40)=32.82; $p < 0.001$; Fig. 6a], TNF- α [F(1,40)=88.94; $p < 0.001$; Fig. 6b] NO_x [F(1,40)=11.25; $p < 0.01$; Fig. 6c] and water content [F(1,40)=50.22; $p < 0.001$; Fig. 6d]. The statistical analysis also demonstrated that-HOE-140 (10 nmol/kg;

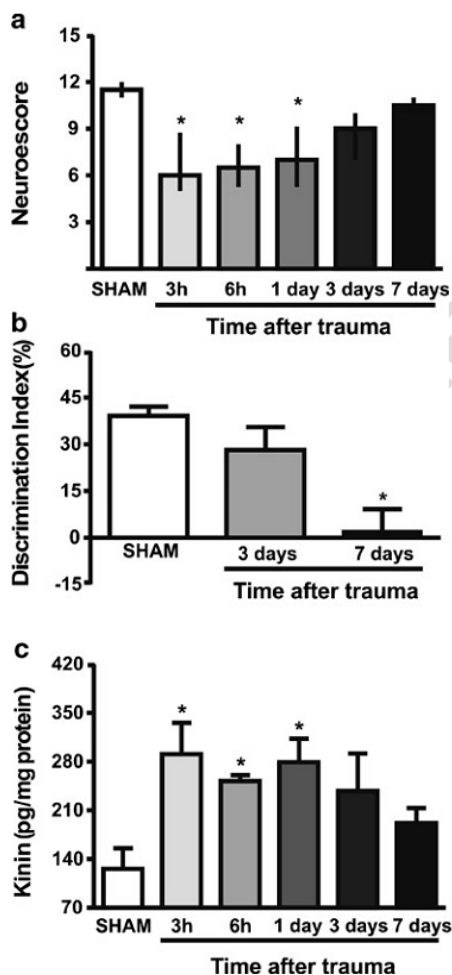


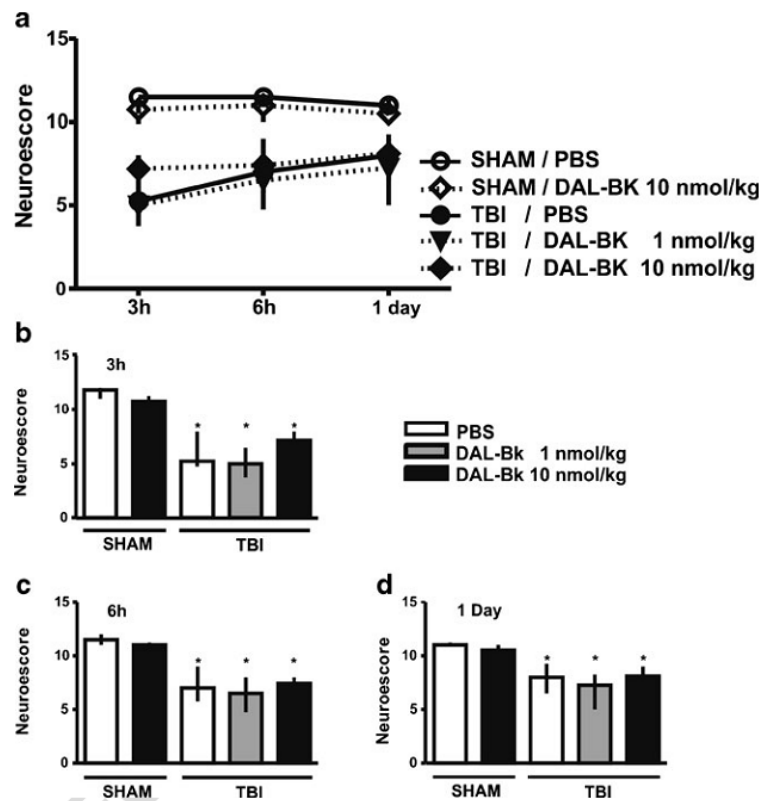
Fig. 2 mLFPI induces neuromotor impairment (a), recognition memory deficit (b), and Bradykinin release (c). Values represent mean \pm SEM or median and interquartile for $n=4-9$ per group. * $P < 0.05$ compared with sham group (Newman-Keuls multiple comparison test or Dunn's multiple comparison test)

AUTHOR'S PROOF!

JrnID 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology

Fig. 3 Effect of B₂R antagonist (DAL-Bk) on neuromotor impairment induced by mLFPI. The post hoc analysis performed at each time point is shown in Fig. 3b–d. Values represent median and interquartile for $n=6-7$ per group. * $P<0.05$ compared with Sham/PBS group (Dunn's multiple comparison test)



s.c) significantly attenuated mLFPI-induced increase in IL-1 β [$F(1.40)=4.09$; $p<0.05$; Fig. 6a] and TNF- α content [$F(1.40)=20.93$; $p<0.001$; Fig. 6b]. In addition, the administration of this B₂R antagonist protected against mLFPI-induced NO_x content [$F(1.40)=7.84$; $p<0.01$; Fig. 6c] and water content [$F(1.40)=8.56$; $p<0.01$; Fig. 6d].

Effect of HOE-140 on NADPH oxidase and oxidative stress

Studies have indicated that B₂R receptor activation induces increase in NADPH oxidase activity in astrocytes and endothelial cells (Liu et al. 2009; Hsieh et al. 2010). Thus, we decided to verify whether HOE-140 alters the NADPH oxidase activity after mLFPI. The data analysis demonstrated that mLFPI increased NADPH oxidase activity when analyzed 3 h and 1 day after trauma [$F(1.47)=4.81$; $p<0.05$; Fig. 7a] and that HOE-140 (10 nmol/kg; s.c) attenuated this effect elicited by mLFPI [$F(1.47)=5.36$; $p<0.05$; Fig. 7a]. The statistical analyses also showed that mLFPI increased the protein carbonyl content [$F(1.52)=4.95$; $p<0.05$; Fig. 7d), TBARS [$F(1.53)=8.47$; $p<0.01$; Fig. 7c] and also decreased Na⁺K⁺ ATPase activity [$F(1.53)=31.49$; $p<0.001$, Fig. 7b]. We also showed that Hoe-140 (10 nmol/kg; s.c) attenuated the increase in protein carbonyl [$F(1.52)=5.23$; $p<0.05$; Fig. 7d], TBARS

[$F(1.53)=4.79$; $p<0.05$; Fig. 7c] and protected against the inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity [$F(1.53)=4.97$; $p<0.05$; Fig. 7b] induced by mLFPI.

HOE-140 decreases cortical lesion volume

Statistical analyses of the lesion volume demonstrated that mLFPI induced a large cortical contusion injury [$F(1.20)=49.44$; $p<0.0001$; Fig. 8a], as shown in representative Fig. 8d (TBI/PBS; 15.2 ± 1.8) vs. Fig. 8b (SHAM/PBS; 2.8 ± 0.6 mm³). The treatment with Hoe-140 significantly reduced the lesion volume induced by trauma [$F(1.20)=5.442$; $p<0.05$; Fig. 8a] as demonstrated by representative Fig. 8e (TBI/HOE; 7.7 ± 1.3 mm³). The stereological analysis of lesions revealed that mLFPI induced a marked loss of gray matter and a perilesional area with several necrotic neurons. In some cases, there was loss of white matter and a slight inflammatory infiltrate composed primarily of neutrophils and hemorrhage. On the other hand, in the sham animals we observed a slight loss of focal gray matter characterized by a moderate dimple in the neural parenchyma. The traumatized animals treated with Hoe 140 also showed marked loss of gray matter, but no loss of white matter. A minor inflammatory infiltrate

AUTHOR'S PROOF!

Fig. 4 Effect of B₂R antagonist (HOE-140) on neuromotor impairment induced by mLFPI. The post hoc analysis performed at each time point is shown in Fig. 3b–d. Values represent median and interquartile range for *n* = 6–7 per group. **P* < 0.05 compared with Sham/PBS group (Dunn's multiple comparison test)

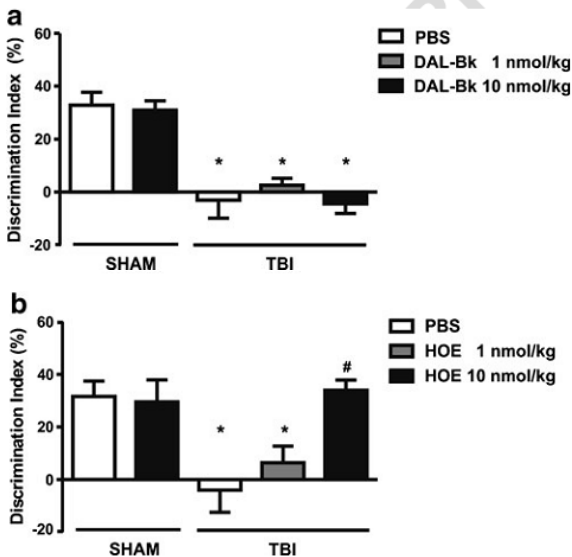
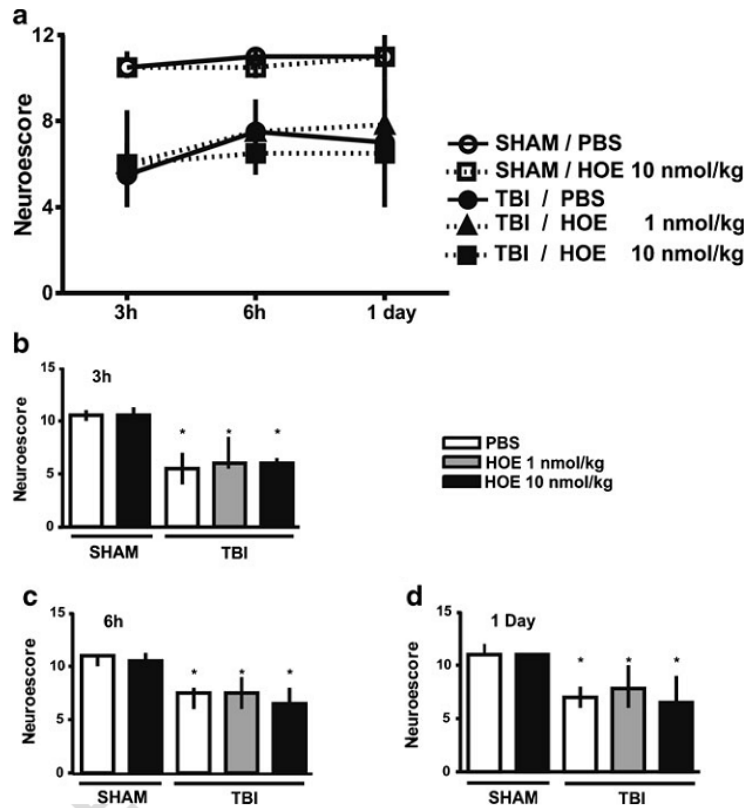


Fig. 5 Effect of antagonists of bradykinin receptors on recognition memory impairment induced by mLFPI. DAL-Bk (a) has no effect on memory deficit. HOE-140 (b) at dosage of 10 nmol/kg reverses the recognition memory deficit. Values represent mean \pm SEM for *n* = 6–7 per group. **P* < 0.05 compared with Sham/PBS group. #*P* < 0.05 compared with TBI/PBS group (Newman-Keuls multiple comparison test)

composed predominantly of lymphocytes around blood vessels was also found.

Discussion

In the present study we demonstrated that mLFPI-induced neurological dysfunction characterized by early neuromotor dysfunction increased kinin levels in the ipsilateral cortex and memory impairment 7 days after brain injury. Our data also showed that the treatment with B₂R antagonist (HOE-140;

Table 1 Locomotor and exploratory activity 7 days after mLFPI

Groups	Crossing	Rearing
Sham/PBS	156.0 \pm 16.4	64.6 \pm 3.9
Sham/HOE-140 10 nmol/kg	160.4 \pm 17.8	71.8 \pm 3.2
TBI/PBS	169.4 \pm 32.2	66.1 \pm 10.2
TBI/HOE-140 1 nmol/kg	157.2 \pm 7.3	68.7 \pm 10.2
TBI/HOE-140 10 nmol/kg	163.6 \pm 17.1	65.4 \pm 5.4

The tested treatments did not alter the locomotor and exploratory activity of mice. Data are mean \pm SEM for *n* = 6–7 per group

AUTHOR'S PROOF!

JrnID 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology

Table 2 Anxiolytic- or anxiogenic-like behavior 7 days after mLFPI

Group	%T.O.	%No.E.O.	%T.E.	%No.E.E.	%T.M.
Sham/PBS	12.1±5	25.01±6.6	71.5±6.1	75±6.6	16.3±1.8
Sham/HOE-140 10 nmol/kg	9.3±3.4	16.2±5.7	80.2±4.4	83.8±5.7	10±2.7
TBI/PBS	18.3±3.4	33.6±4.8	65.6±6.2	66.4±4.8	16.2±3.5
TBI/HOE-140 1 nmol/kg	11.5±4.2	18.4±3.6	72.1±5.7	81.6±3.4	16.4±2.1
TBI/HOE-140 10 nmol/kg	7.3±6.2	16.2±8.1	80.1±7.1	83.8±8.1	12.7±2.7

The tested treatments did not alter the anxiogenic-like behavioral of mice. Data are mean ± SEM for $n=6-7$ in each group

%T.O. percent of time spent in open arms, %No.E.O. percent of number of entries in open arms, %T.E. percent of time spent in enclosed arms, %No.E.E. percent of number of entries in enclosed arms, %T.M. percent of time spent in the central area

1–10 nmol/kg) or B₁R antagonist (DAL-Bk; 1 or 10 nmol/kg) had no effect on neuromotor dysfunction, however the memory impairment caused by trauma was significantly reversed by HOE-140 (10 nmol/kg; s.c). It is important to note that all pharmacological treatment used in the present study did not alter locomotor and/or anxiety-like behavior when analyzed 7 days after mLFPI, suggesting that the behavioral effects currently reported cannot be attributed to possible unspecific locomotor and/or anxiogenic-like behavior. The B₂R antagonist administration also protected against mLFPI-induced IL-1 β , TNF- α , NO_x and brain edema when analyzed 3 h and 1 day after injury. Moreover, the B₂R antagonist attenuated the NADPH oxidase activity 3 h and 1 day after brain trauma, reduced the oxidative damage (protein carbonyl,

TBARS) and also attenuated the inhibition of Na⁺K⁺-ATPase activity induced by mLFPI. The present results were accompanied by and effective reduction in lesion volume.

The CNS of mammals contains all of the components of the kallikrein–kinin system (Walker et al. 1995). Brain regions (e.g., perirhinal cortex, periaqueductal gray matter, and hippocampus) that show the earliest manifestations under pathological conditions are also regions where elements of the kinin system including B₂ receptors, are most prominently expressed (Correa et al. 1979; Noda et al. 2003; Groger et al. 2005). In this study, we showed that mLFPI induced increased kinin levels in ipsilateral cortex 3 h, 6 h, and 1 day after neuronal injury. These data are in agreement with previous studies that suggested the involvement of kallikrein–kinin

Fig. 6 HOE-140 attenuates the mLFPI-induced increase in IL-1 β (a), TNF- α (b), NO_x (c), and water content (d) 3 h and 1 day after brain lesion. Values represent mean ± SEM for $n=6-7$ per group. * $P<0.05$ compared with Sham/PBS groups. # $P<0.05$ compared with TBI/PBS groups (three-way ANOVA); + $P<0.05$ compared with NAIVE groups (Newman–Keuls multiple comparison test)

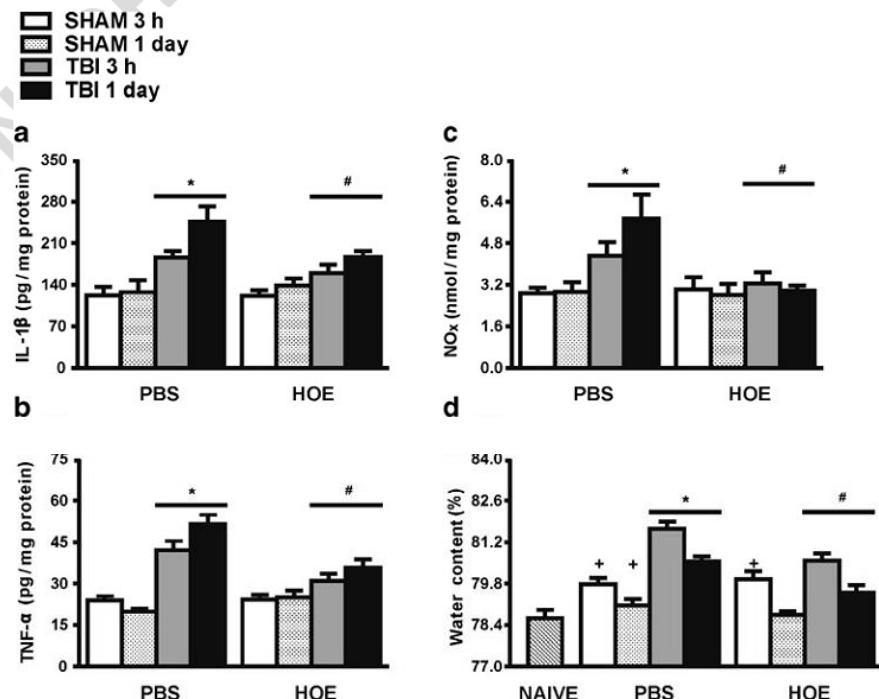
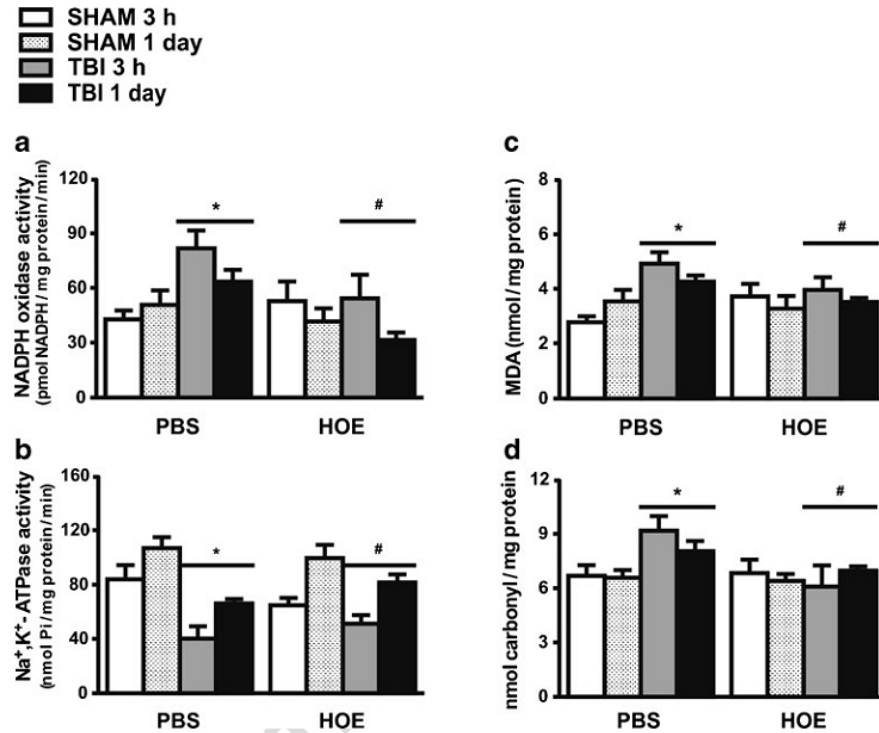


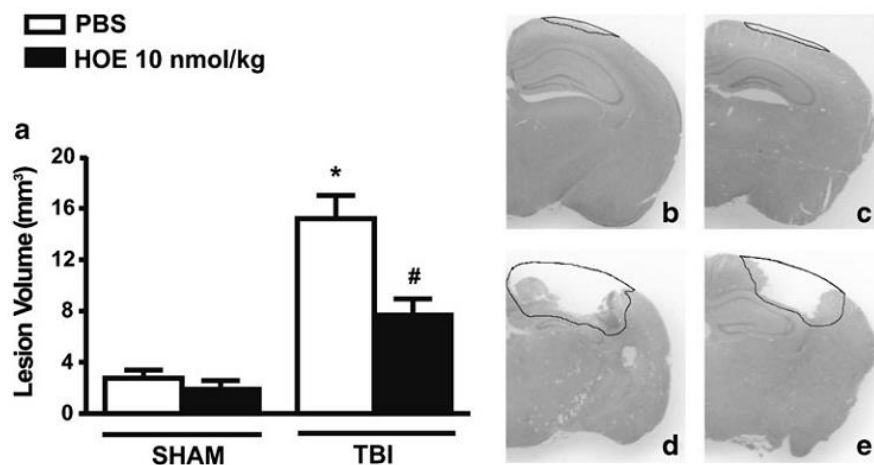
Fig. 7 HOE-140 attenuates the mLFPI-induced increase in NADPH oxidase activity (a), inhibition of Na⁺, K⁺, and ATPase (b), increase in TBARS content (c), and increase in protein carbonyl content (d) 3 h and 1 day after brain lesion. Values represent mean ± SEM for *n* = 7–9 per group. **P* < 0.05 compared with Sham/PBS groups. #*P* < 0.05 compared with TBI/PBS groups (three-way ANOVA)



system in TBI, and others acute disorders of CNS (Groger et al. 2005; Austinat et al. 2009). Our data showed that treatment with B₁ and B₂ receptor antagonists did not alter transient motor dysfunction. On the other hand, the results presented in this report, for the first time, revealed that mLFPI-induced impairment of the object recognition memory and that the treatment with B₂R antagonist (HOE-140) significantly reversed the deficit in object recognition memory in mice. The HOE-140 treatment also attenuated the mLFPI-induced

induced increase in IL-1β, TNF-α content. This anti-inflammatory effect elicited by pharmacological B₂R blockade corroborates previous studies that have demonstrated the involvement of this pathway to deleterious effects after ischemic brain insult (Su et al. 2009) and closed head trauma in rats (Kaplanski et al. 2003). Taken together, these data suggest that early blockade of pro-inflammatory mediators may improve the memory in later cognitive tests. In fact, recent studies have found that TNF-α synthesis inhibitor as well as the

Fig. 8 HOE-140 attenuates the mLFPI-induced brain lesion volume (a). Representative images of groups Sham/PBS (b), Sham/HOE (c), TBI/PBS (d), and TBI/HOE (e). Values represent mean ± SEM for *n* = 6 per group. **P* < 0.05 compared with Sham/PBS group. #*P* < 0.05 compared with TBI/PBS group (two-way ANOVA)



AUTHOR'S PROOF!

JrnllD 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology

neutralization of IL-1 β improves the cognitive outcome following traumatic brain injury in mice (Clausen et al. 2009; Baratz et al. 2011).

In this study, we showed a significant increase in kinin production and cerebral water content after brain injury. This finding reinforces the involvement of kinins in brain edema, and suggests the important role of bradykinin B₂ receptor in brain edema. In line with this view, several studies has demonstrated that bradykinin receptor antagonists reduce brain edema and the blood–brain barrier breakdown in different models of trauma (Stover et al. 2000; Gorlach et al. 2001; Plesnila et al. 2001; Kaplanski et al. 2002; Hellal et al. 2003; Ivashkova et al. 2006). The results presented in this report also revealed that mLFPI increased both NO_x and kinin content at the time intervals of 3 h and 1 day after injury, and that HOE-140 abolished the increase in NO_x content, suggesting that NO production induced by the bradykinin B₂ receptor may be involved in brain edema in this model of neuronal injury. However, it is important to note that HOE-140 totally abolished the increase in NO_x content induced by mLFPI, but only attenuated the brain edema, suggesting the existence of other molecules that mediate both vasogenic and cytotoxic brain edema. In this context, it has been demonstrated that aquaporins, substance P, matrix metalloproteinase, prostaglandins, histamine, and free radicals are also possible targets for the treatment of brain edema after brain injury (Unterberg et al. 2004; Stokely and Orr 2008; Donkin and Vink 2010; Ayer et al. 2011). Another point to consider is that excessive amount of NO caused by high activity of both isoforms of NOS (constitutive and inducible enzymes) seems to be involved in protein nitration, apoptosis, exacerbation of brain lesion, and neurological impairments induced by various models of TBI (Wada et al. 1998a, b, 1999; Lu et al. 2003; Gahm et al. 2006). These literature findings reinforce the beneficial action of HOE-140, since it also reduced the cortical NO_x content after mLFPI.

Several studies have shown that oxidative damage is linked to the pathophysiology of secondary damage (Potts et al. 2006; Lima et al. 2008). One mechanism of reactive oxygen species (ROS) production after TBI is the increase of pro-oxidant enzymes activity (Gilgun-Sherki et al. 2002) involved in inflammatory process, such as NADPH oxidase. Thus, one remarkable finding of this study is that mLFPI increased the NADPH oxidase activity and that in vivo pharmacological blockade of B₂R attenuates the TBI-induced increase in NADPH oxidase activity. Our data also revealed that HOE-140 protects against mLFPI-induced protein carbonylation and TBARS increase. These data agree with idea that the stimulatory effect of bradykinin on B₂R leads to production of reactive oxygen species, dependent on NADPH oxidase activity in rat brain astrocytes cell cultures (Liu et al. 2009; Hsieh et al. 2010; Lin et al. 2012). Furthermore, our data revealed that HOE-140 also protected against mLFPI-

induced protein carbonylation and TBARS increase. It is well known that ROS increase drastically after injury, leading to damage of lipids, proteins, nucleic acids, and, consequently, to cell death by necrosis or apoptosis (Gilgun-Sherki et al. 2002). In brain injury models, it has been postulated that free radicals induce blood–brain barrier breakdown (Pun et al. 2009) and failure of energy metabolism (Silva et al. 2011). Moreover, the effective protection against neuronal death elicited by classical antioxidants treatment (Clausen et al. 2004; Ates et al. 2007; Aiguo et al. 2010; Singleton et al. 2010), reinforcing the role of ROS in several rodent TBI models. Considering that a vast body of evidences indicates the involvement of ROS in progression of damage induced by TBI, the protective effects HOE-140 may be due, at least in part, to its ability of reduce the NADH oxidase activity and the oxidative stress.

The Na⁺, K⁺-ATPase enzyme is the main factor responsible for maintaining ion gradients across plasma membranes and it is main ATP consumer in neurons (Silva et al. 2011). In this context, the Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition evidenced in this report reinforce the idea that selected targets for oxidative damage such as Na⁺, K⁺-ATPase may be related to secondary damage induced by TBI (Zhan et al. 2004). Furthermore, since the Na⁺, K⁺-ATPase enzyme is especially sensitive to oxidative stress (Jamme et al. 1995; Lima et al. 2008, 2009; Souza et al. 2009), it is plausible to propose that the increase in oxidative stress markers induced after B₂R activation occur in parallel to the decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity in this model of TBI.

When our findings are taken together, we speculate that the sum of protective actions of HOE-140 shown in this study, break the progression of secondary brain damage resulting in a minor brain lesion that will impact on better cognitive performance. To corroborate this hypothesis, we performed a histological analysis 7 days post trauma (the time in which memory deficits were developed) and showed that treatment with HOE-140 reduced the lesion volume induced by trauma. Nowadays, the mechanisms underlying the development of cognitive deficits after TBI remain elusive. For instance, while pathologic examination of post-traumatic human brains demonstrate that specific damage to temporal lobe are associated with cognitive deficit after TBI (Theodoros et al. 1998), cognitive deficits suffered by many mild TBI patients are not always correlated with loss of the cells (Writer and Schillerstrom 2009). Here, we showed that mLFPI induced brain damage, characterized by lesion volume, and that treatment with HOE-140 was effective in reducing lesion volume when analyzed 7 days after brain injury. This result is in agreement with previous studies that have demonstrated that B₂ receptor has protective effects against neurodegeneration induced by different models of brain lesion (Grogger et al. 2005; Klasner et al. 2006; Trabold et al. 2010; Yang et al. 2013). On the other hand, a stimulatory effect of nerve growth factor on B₂R expression (Lee et al. 2002) and an anti-

inflammatory role for bradykinin (Noda et al. 2007) has been proposed in studies performed with cell cultures, indicating a neuroregenerative role for BK. Although the reason for this discrepancy of results cannot be determined, the different features of animal models and cell cultures may account for it. Thus, our data indicate that B₂R in vivo activation may be involved in the secondary brain injury induced by TBI, which results in additional expansion of the primary lesion and memory impairment.

In summary, the present study demonstrated that treatment with HOE-140 at dose of 10 nmol/kg is effective in protecting against inflammatory and oxidative damage-induced traumatic brain injury and consequently prevents the increase in lesion volume. These reported effects of HOE-140 may influence in development of the cognitive deficits that here was evaluated as the reduction in recognition memory. The present data suggest a new insight into the mechanism involved in the TBI-induced cognitive disorder, but more studies are necessary to determine the clinical potential for B₂R blockade for treatment of TBI.

Acknowledgments The present study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES; Brazil). Ferreira J is the recipient of CNPq fellowships, grant numbers 301552/2007-0. Royes L.F.F is recipient of CNPq/FAPERGS fellowships, grant numbers 11/2082-4. The funding sources had no involvement in study design, in the collection, analysis, interpretation of data, and in the writing of the report. We also attest that all the experiments were performed in compliance with Brazilian (law no. 6638 of 1979—Standards for the Practice Teaching-scientific Animal use) law currently in force, and that experiments were previously approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of the Federal University of the Santa Maria (process number: 113/2010).

References

- Aiguo W, Zhe Y, Gomez-Pinilla F (2010) Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 24:290–298. doi:10.1177/1545968309348318
- Albert-Weissenberger C, Stetter C, Meuth SG, Gobel K, Bader M, Siren AL, Kleinschnitz C (2012) Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1747–1756. doi:10.1038/jcbfm.2012.62
- Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Sener M, Kocak A, Yologlu S (2007) Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem* 294:137–144. doi:10.1007/s11010-006-9253-0
- Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, Renne T, Kleinschnitz C (2009) Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* 40:285–293. doi:10.1161/STROKEAHA.108.526673
- Ayer R, Jadhav V, Sugawara T, Zhang JH (2011) The neuroprotective effects of cyclooxygenase-2 inhibition in a mouse model of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 111:145–149. doi:10.1007/978-3-7091-0693-8_24
- Baratz R, Tweedie D, Rubovitch V, Luo W, Yoon JS, Hoffer BJ, Greig NH, Pick CG (2011) Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor, 3,6'-dithiothalidomide, reverses behavioral impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. *J Neurochem* 118:1032–1042. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07377.x
- Bay E, Covassin T (2012) Chronic stress, somatic and depressive symptoms following mild to moderate traumatic brain injury. *Arch Psychiatr Nurs* 26:477–486. doi:10.1016/j.apnu.2012.06.002
- 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
- Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS (1998) Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J Neurotrauma* 15:217–229
- Chao J, Woodley C, Chao L, Margolius HS (1983) Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J Biol Chem* 258:15173–15178
- Clausen F, Lundqvist H, Ekmark S, Lewen A, Ebendal T, Hillered L (2004) Oxygen free radical-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis-like cell death after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21:1168–1182. doi:10.1089/neu.2004.21.1168
- Clausen F, Hanell A, Bjork M, Hillered L, Mir AK, Gram H, Marklund N (2009) Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* 30:385–396. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06820.x
- Correa FM, Innis RB, Uhl GR, Snyder SH (1979) Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1489–1493
- Donkin JJ, Vink R (2010) Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol* 23:293–299. doi:10.1097/WCO.0b013e328337f451
- Gahm C, Holmin S, Wiklund PN, Brundin L, Mathiesen T (2006) Neuroprotection by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experimental brain contusion. *J Neurotrauma* 23:1343–1354. doi:10.1089/neu.2006.23.1343
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 54:271–284
- Gorlach C, Hortobagyi T, Hortobagyi S, Benyo Z, Relton J, Whalley ET, Wahl M (2001) Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. *J Neurotrauma* 18:833–838. doi:10.1089/089771501316919193
- Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, Plesnila N (2005) Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:978–989. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600096
- Hall JM (1992) Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 56:131–190
- Hellal F, Pruneau D, Palmier B, Faye P, Croci N, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C (2003) Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 20:841–851. doi:10.1089/089771503322385773
- Hsieh HL, Wang HH, Wu CY, Yang CM (2010) Reactive oxygen species-dependent c-Fos/activator protein 1 induction upregulates heme oxygenase-1 expression by bradykinin in brain astrocytes. *Antioxid Redox Signal* 13:1829–1844. doi:10.1089/ars.2009.2957
- Ivashkova 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. doi:10.1097/01.ta.0000234722.98537.01

AUTHOR'S PROOF!

JmllID 213_ArtID 3336_Proof# 1 - 31/10/2013

Psychopharmacology

- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (1995) Modulation of mouse cerebral Na^+ , K^+ -ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333–337
- Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Shapira Y (2002) LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J Neurotrauma* 19:953–964. doi:10.1089/089771502320317104
- Kaplanski J, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Pruneau D, Shapira Y (2003) LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. *Resuscitation* 56:207–213
- Klasner B, Lumenta DB, Pruneau D, Zausinger S, Plesnila N (2006) Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int* 49:442–447. doi:10.1016/j.neuint.2006.02.010
- Komada M, Takao K, Miyakawa T (2008) Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp*. doi:10.3791/1088
- Lee YJ, Zachrisson O, Tonge DA, McNaughton PA (2002) Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 19:186–200. doi:10.1006/mcne.2001.1073
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478
- 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^+ , K^+ -ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res* 193:306–310. doi:10.1016/j.bbr.2008.05.013
- 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^+ , K^+ -ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res* 1279:147–155. doi:10.1016/j.brainres.2009.04.052
- Lin CC, Hsieh HL, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Chen JC, Yang CM (2012) NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signal contributes to bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes. *Cell Commun Signal* 10:35. doi:10.1186/1478-811X-10-35
- Liu HT, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ, Okada Y (2009) Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol* 587:2197–2209. doi:10.1113/jphysiol.2008.165084
- Lu J, Moochhala S, Shirhan M, Ng KC, Teo AL, Tan MH, Moore XL, Wong MC, Ling EA (2003) Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. *Neuropharmacology* 44:253–263
- Marceau F, Regoli D (2004) Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 3:845–852. doi:10.1038/nrd1522
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62–71. doi:10.1006/niox.2000.0319
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99:6–38
- Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K (2003) Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 72:1573–1581
- Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H, Wada K (2007) Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem* 101:397–410. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04339.x
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, Erskat J, Pruneau D, Baethmann A (2001) Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 18:1049–1058. doi:10.1089/08977150152693746
- Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Hausslein LJ (2006) Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 3:143–153. doi:10.1016/j.nurx.2006.01.006
- Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, McIntosh TK (1998) BCL-2 overexpression attenuates cortical cell loss after traumatic brain injury in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1259–1269. doi:10.1097/00004647-199811000-00013
- Raidoo DM, Bhoola KD (1998) Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 79:105–127
- Raslan F, Schwarz T, Meuth SG, Austinat M, Bader M, Renne T, Roosen K, Stoll G, Siren AL, Kleinschnitz C (2010) Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood-brain barrier leakage and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1477–1486. doi:10.1038/jcbfm.2010.28
- Schneider Oliveira M, Flavia Furian A, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, de Carvalho Myskiw J, Gindri Fiorenza N, Mello CF (2004) Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721–728. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.07.012
- Silva LF, Hoffmann MS, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Furian AF, Oliveira MS, Figuera MR, Royes LF (2011) The involvement of Na^+ , K^+ -ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. *J Neurosci* 30:35–40. doi:10.1016/j.jns.2011.06.030
- Silva LF, Hoffmann MS, Gerbatin R, Fiorin F, Dobrachinski F, Mota BC, Wouters AT, Soares FA, Pavarini SP, Figuera MR, Royes LF (2013) Treadmill exercise protects against pentylentetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. doi:10.1089/neu.2012.2577
- Singleton RH, Yan HQ, Fellows-Mayle W, Dixon CE (2010) Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27:1091–1099. doi:10.1089/neu.2010.1291
- Sosin DM, Sniezek JE, Waxweiler RJ (1995) Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure. *JAMA* 273:1778–1780
- Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF (2009) Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50:811–823. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01908.x
- Stokely ME, Orr EL (2008) Acute effects of calvarial damage on dural mast cells, pial vascular permeability, and cerebral cortical histamine levels in rats and mice. *J Neurotrauma* 25:52–61. doi:10.1089/neu.2007.0397
- Stover JF, Dohse NK, Unterberg AW (2000) Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg* 92:853–859. doi:10.3171/jns.2000.92.5.0853

AUTHOR'S PROOF!

Psychopharmacology

- Thannickal VJ, Fanburg BL (1995) Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 270:30334–30338
- Theodoros DG, Shrapnel N, Murdoch BE (1998) Motor speech impairment following traumatic brain injury in childhood: a physiological and perceptual analysis of one case. *Pediatr Rehabil* 2:107–122
- Trabold R, Eros C, Zweckberger K, Relton J, Beck H, Nussberger J, Muller-Esterl W, Bader M, Whalley E, Plesnila N (2010) The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:130–139. doi:10.1038/jcbfm.2009.196
- Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129:1021–1029. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.046
- Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, Dietrich WD (1998a) Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J Neurosurg* 89:807–818. doi:10.3171/jns.1998.89.5.0807
- Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD (1998b) Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43:1427–1436
- Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, Dietrich WD (1999) Effects of L-NAME and 7-NI on NOS catalytic activity and behavioral outcome after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 16:203–212
- Werner C, Engelhard K (2007) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 99:4–9. doi:10.1093/bja/aem131
- Writer BW, Schillerstrom JE (2009) Psychopharmacological treatment for cognitive impairment in survivors of traumatic brain injury: a critical review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21:362–370. doi:10.1176/appi.neuropsych.21.4.362
- Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349–351. doi:10.1006/abio.1995.1362
- Yang CM, Hsieh HL, Lin CC, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Hsiao LD (2013) Multiple factors from bradykinin-challenged astrocytes contribute to the neuronal apoptosis: involvement of astroglial ROS, MMP-9, and HO-1/CO system. *Mol Neurobiol* 47:1020–1033. doi:10.1007/s12035-013-8402-1
- Zhan H, Tada T, Nakazato F, Tanaka Y, Hongo K (2004) Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. *Neurol Res* 26:35–40. doi:10.1179/016164104773026507
- Ziebell JM, Bye N, Semple BD, Kössmann T, Morganti-Kossmann MC (2011) Attenuated neurological deficit, cell death and lesion volume in Fas-mutant mice is associated with altered neuroinflammation following traumatic brain injury. *Brain Res* 1414:94–105. doi:10.1016/j.brainres.2011.07.056
- Zink BJ (2001) Traumatic brain injury outcome: concepts for emergency care. *Ann Emerg Med* 37:318–332. doi:10.1067/mem.2001.113505
- Zweckberger K, Eros C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, Plesnila N (2006) Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma* 23:1083–1093. doi:10.1089/neu.2006.23.1083

3.2. Capítulo II:

3.2.1. The effect of NADPH-oxidase inhibitor Apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage



The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: Role of inflammatory and oxidative brain damage

Ana Paula Oliveira Ferreira^{a,b}, Fernanda Silva Rodrigues^{a,b}, Iuri Domingues Della-Pace^{a,b}, Bibiana Castagna Mota^{a,b}, Sara Marchesan Oliveira^b, Camila de Campos Velho Gewehr^b, Franciane Bobinski^c, Clarissa Vasconcelos de Oliveira^d, Juliana Sperotto Brum^e, Mauro Schneider Oliveira^d, Ana Flavia Furian^f, Claudio Severo Lombardo de Barros^e, Juliano Ferreira^b, Adair Roberto Soares dos Santos^c, Michele Rechia Figuera^{a,b,g}, Luiz Fernando Freire Royes^{a,b,*}

^a 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, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^e Departamento de Patologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^f Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^g Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2013

Received in revised form 7 September 2013

Accepted 16 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Traumatic brain injury

NADPH oxidase

Apocynin

Object recognition task

Oxidative stress

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a devastating disease that commonly causes persistent mental disturbances and cognitive deficits. Although studies have indicated that overproduction of free radicals, especially superoxide (O_2^-) derived from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase is a common underlying mechanism of pathophysiology of TBI, little information is available regarding the role of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, in neurological consequences of TBI. Therefore, the present study evaluated the therapeutic potential of apocynin for treatment of inflammatory and oxidative damage, in addition to determining its action on neuromotor and memory impairments caused by moderate lateral fluid percussion injury in mice (mLFPI). Statistical analysis revealed that apocynin (5 mg/kg), when injected subcutaneously (s.c.) 30 min and 24 h after injury, had no effect on neuromotor deficit and brain edema, however it provided protection against mLFPI-induced object recognition memory impairment 7 days after neuronal injury. The same treatment protected against mLFPI-induced IL-1 β , TNF- α , nitric oxide metabolite content (NO_x) 3 and 24 h after neuronal injury. Moreover, apocynin treatment reduced oxidative damage (protein carbonyl, lipoperoxidation) and was effective against mLFPI-induced Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition. The present results were accompanied by effective reduction in lesion volume when analyzed 7 days after neuronal injury. These data suggest that superoxide (O_2^-) derived from NADPH oxidase can contribute significantly to cognitive impairment, and that the post injury treatment with specific NADPH oxidase inhibitors, such as apocynin, may provide a new therapeutic approach to the control of neurological disabilities induced by TBI.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is characterized as an insult to the brain caused by an outside force, resulting in skull fractures, intra-

cranial injuries, loss of consciousness and motor functional deficits. The brain damage induced by TBI results from both the primary mechanical impact and secondary degenerative response (Davis, 2000). Secondary mechanisms are potentially amenable to post-injury therapeutic intervention because of their delayed onset and include neuroinflammation, oxidative stress, brain edema and delayed cell death (Lotocki et al., 2009; Toklu et al., 2009; Zhang et al., 2012). It is important to note that the survival rate from TBI has been improved with modern clinical management practices.

* Corresponding author. Address: Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.

E-mail address: nandoroyes@yahoo.com.br (L.F.F. Royes).

However many survivors of TBI still display neuronal death and suffer from permanent cognitive impairment (Singh, 2003).

In line with this view, a considerable body of evidence has indicated that oxidative stress and functional deficits occurring after TBI are interrelated events and studies of the mechanisms involved in this interface can open new avenues to better understanding of TBI (Lima et al., 2008; Marklund et al., 2001). Furthermore, it has been demonstrated that ROS production elicited by TBI induces cellular death (Clausen et al., 2004), blood brain barrier breakdown (BBB) (Pun et al., 2009) and failure of energy metabolism after brain injury (Arun et al., 2013; Prins, 2008). The mechanisms of ROS production include mitochondrial breakdown, intracellular calcium overload and increase in activity of pro-oxidant enzymes (Lambert and Brand, 2009; Lewen et al., 2000; Solaroglu et al., 2005; Zhang et al., 2012).

The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) is a pro-oxidant enzyme that catalyzes the reduction of molecular oxygen and oxidation of NADPH to generate superoxide radicals (O_2^-) (Bedard and Krause, 2007; Infanger et al., 2006; Kahles and Brandes, 2012). NADPH oxidase is a multi-unit enzyme composed of several subunits that include several isoforms of NOX (NOX 1–5) (Bedard and Krause, 2007). Although few studies have evaluated the role of gp91^{phox} (catalytic subunit of the enzyme, NOX₂) in TBI, experimental evidences suggest that use of specific NADPH oxidase inhibitors may have significant efficacy in the treatment of TBI (Dohi et al., 2010; Lo et al., 2007). A candidate for this is Apocynin, a natural organic compound isolated from the Himalayan medicinal herb *Picrohiza kurroa* used as an efficient inhibitor of the NADPH-oxidase complex (Hayashi et al., 2005; Stolk et al., 1994; Van den Worm et al., 2001). Recently, it was demonstrated that treatment with high doses of apocynin protected against ROS production, microglial activation, BBB disruption and neuronal death after weight drop brain injury in rats (Choi et al., 2012). Moreover, pre- or post-treatment with apocynin protects against early microglial activation, reduces lipoperoxidation and deposition of b-amyloid protein after controlled cortical impact in mice (Zhang et al., 2012). It is important to note that treatment with apocynin prior to diffuse brain injury also attenuates the expression and activation of NOX₂ protein, in addition to reducing brain edema and spatial learning deficit after neuronal injury (Song et al., 2012).

Although there is increasing evidence supporting the role of NADPH oxidase in the pathology of TBI, more detailed studies are required to assess the antioxidant potential of apocynin administration in diseases that present cognitive impairment, such as TBI. For this purpose, we evaluated the effect of apocynin treatment on inflammatory and oxidative damage, and determining its actions on neuromotor and memory impairments caused by moderate fluid percussion injury in mice (mLFPI).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Apocynin, bovine serum albumin, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), trichloroacetic acid (TCA), sodium hydroxide (NaOH), sodium dodecyl sulfate (SDS), *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, sulphanilamide, thiobarbituric acid (TBA) 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium chloride ($MgCl_2$) and ouabain adenosine triphosphate (ATP) and sodium molybdate were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Lidocaine hydrochloride and ketamine hydrochloride were obtained from Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (São Paulo, SP, Brazil). Xylazine hydrochloride was obtained from Vallée S.A. –

Produtos Veterinários (São Paulo, SP, Brazil) and ceftriaxone sodium was obtained from SEM Sigma Pharma (S. Bernardo do Campo, SP, Brazil).

2.2. Subjects and maintenance

Male Swiss mice (28–32 g) provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria, were maintained in a room with a controlled temperature (24 ± 1 °C), 12 h light/dark cycle (lights on at 6:00), and standard laboratory chow and tap water *ad libitum*. We attest that all the experiments were conducted in compliance with the current Brazilian Laws (Law No. 6638 of 1979 – Standards for the Teaching–Scientific Practice of Animal use) and that experiments were previously approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of the Federal University of Santa Maria (process number: 113/2010).

2.3. Experimental design

To determine the best dose of apocynin for the treatment of neuromotor and cognitive deficits induced by mLFPI, the animals were injected subcutaneously (s.c.) with vehicle (5% ethanol in saline solution) or apocynin (at doses of 0.05, 0.5 or 5 mg/kg) 30 min and 24 h after induction of TBI. The neuromotor evaluation was performed at time intervals of 3 h, 6 h, and 1 day after injury. The memory test and histological analyses were performed 7 days after injury, as described in Fig. 1A.

In order to determine whether the treatment effective against memory deficit also protects against biochemical alterations induced by mLFPI, the animals were injected s.c. with vehicle (5% ethanol in saline solution) or apocynin (5 mg/kg) 30 min and 24 h after injury, and biochemical analysis were performed 3 h and 1 day after neuronal injury, as described in Fig. 1B.

2.4. Traumatic brain injury

The moderate lateral fluid percussion injury (mLFPI) was induced according to the method of Carbonell et al. (1998). Briefly, mice were anesthetized with a mixture of xylazine (10 mg/kg)/ketamine (100 mg/kg) and placed in a stereotaxic head holder. The scalp was reflected and the skull exposed through a midline incision. A topical anesthetic 2% lidocaine hydrochloride was applied to the skull and the fascia was scraped from the skull. A burr hole of 3 mm in diameter was drilled in the right parietal bone between bregma and lambda and between the sagittal suture and lateral ridge over the right hemisphere, taking care to keep the dura mater intact. A plastic cannula was placed over the craniotomy with dental cement. When the dental cement hardened the cannula was filled with 4% chloramphenicol and closed with a proper plastic cap. At 24 h after the surgical procedure, the animals were anesthetized with Isoflurane, the injury cannula was attached to the fluid percussion device, and the animals were placed on a heat pad maintained at 37 ± 0.2 °C. TBI was produced by a fluid-percussion device developed in our laboratory. A brief (10–15 ms) transient pressure fluid pulse (1.8 ± 0.41 atm) impact was applied against the exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (hydraulic fluid control, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Tektronix TDS 210). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of mLFPI. Immediately after these procedures, the cannula was topped with dental cement. The time elapsed until the animal spontaneously righted itself was recorded as an acute neurological assessment, and defined as the righting reflex time (or unconsciousness). The TBI caused immediate unconsciousness that lasted for 219.3 ± 7.0 s, demonstrating that injury induced by LFPI was within the range of moderate injury (Hosseini and

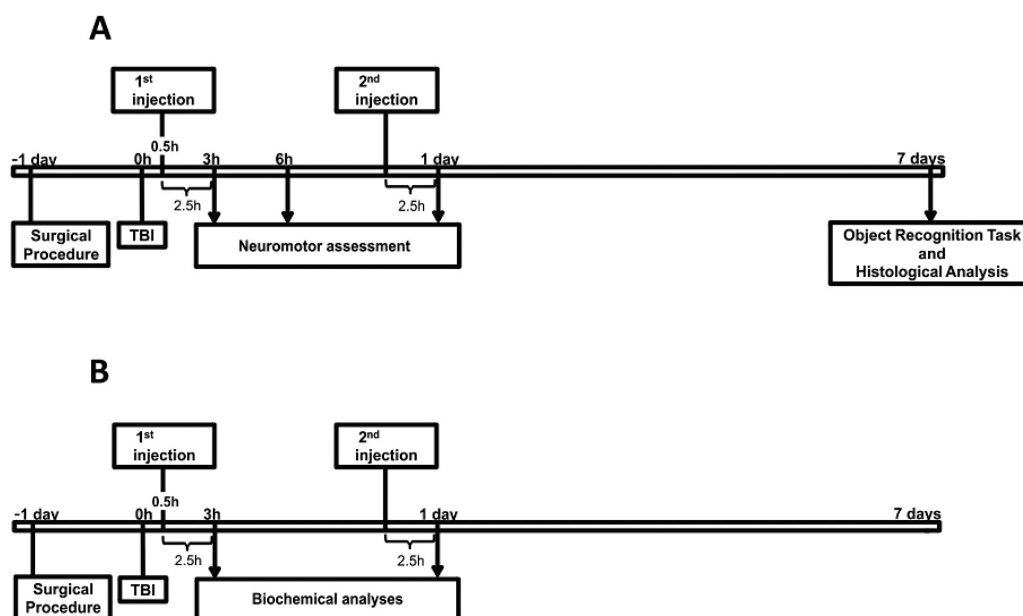


Fig. 1. (A) Representation of experimental design with the effect of apocynin treatment (0.05, 0.5 and 5 mg/kg) on neuromotor assessment 3, 6 and 1 day after mLFPI (B). The effect of apocynin (5 mg/kg, s.c.) on biochemical alterations 3 h and 1 day after neuronal injury. The neuromotor and biochemical analysis were realized 2.5 h after the drug administration. The object recognition task and histological analysis were determined 7 days after neuronal injury.

Lifshitz, 2009; Morehead et al., 1994). All animals received ceftriaxone (200 mg/kg, i.p.) immediately after surgery and after trauma. To reduce the unspecific effect of antibiotic treatment all sham and traumatized animals tested in this study received the same antibiotic therapy. Although, there is no available literature indicating pharmacokinetic interactions between apocynin and ceftriaxone, it is important to note that ceftriaxone has anti-inflammatory and anti-apoptotic properties (Romano et al., 2004).

2.5. Assessment of neuromotor function

The neuromotor function was assessed at time intervals of 3, 6 h and 1 day after injury. These time points were selected from a time course performed in another study, not yet published, in which the TCE caused neuromotor impairment only at the mentioned times. The neuromotor function was determined by means of a neuroscore test, as described by Raghupathi et al. (1998). Briefly, animals were subjected to a grid-walk test for 1 min in order to assess the number of foot-faults. Subsequently, forelimb and hindlimb functions were evaluated by suspending the animals by the tail and observing how they grasped the top of the cage when they were lowered toward it (to test the forelimbs) and the same procedure was used for hindlimb spreading and extension during suspension (to test the hindlimbs). Finally, animals were tested for both right and left resistance to lateral pulsion. Animals were scored from 0 (severely impaired) to 4 (normal) for each of the following indices: fore-limb function, hind-limb function and resistance to lateral pulsion. The maximum score for each animal was 12. Evaluation of neurological motor function was conducted by an experienced investigator who was blinded to all groups.

2.6. Evaluation of object recognition task (ORT) and elevated plus maze

The objects to be discriminated were figures of similar size and texture (8–10 cm high). The objects were selected on the basis of

previous observations, which demonstrated a lack of preferential exploration for one object (A) over the other (B) [exploration of A in seconds was 16.6 ± 3.44 and exploration of B was 16.8 ± 4.09 ; $t(10) = 0.159$; $p > 0.05$]. To avoid olfactory stimuli, the objects to be discriminated were cleaned carefully initially and washed with an ethanol solution (30% in water) after each individual session. The testing arena was a plastic box (width: 20 cm; length: 30 cm; height: 15 cm, with the floor divided into 24 squares measuring 5×5 cm each) that was dimly illuminated so that the environment was visually uniform. Twenty-four hours before testing, the mice were allowed to explore the testing box for 10 min to reduce neophobic responses and habituate to the stimuli present in the empty arena. During this habituation, the open-field test was performed. This test was carried out to identify motor disabilities and lasted for 10 min. During this time, an observer, who was not aware of pharmacological treatments, manually recorded the number of crossing and rearing responses. In the first trial two identical objects were placed in the box. Mice were placed in the box for 5 min and exploratory activity was manually recorded. After a delay of 4 h, mice were re-introduced into the same cage in which one of the objects was replaced by a new one, for 5 min. The cumulative time spent by the mouse at each of the objects was manually recorded by an observer, who was not aware of pharmacological treatments. Exploration of an object was defined as follows: directing the nose to the object or touching it with the nose; turning around or sitting on the object was not considered as exploratory behavior. The percentage of the total exploration time that the animal spent investigating the novel object was the measure of recognition memory, defined by the discrimination index (DI). This was calculated using the following formula: (time spent in investigating the new object) – (time spent in investigating the known object) / (time spent in investigating both objects \times 100).

After ORT, the animals were tested on the elevated plus-maze. The apparatus comprises two open arms (25×5 cm) across from each other and perpendicular to two closed arms ($25 \times 5 \times 15$ cm) with a center platform (5×5 cm). The apparatus is made of wood,

the platform is white and the walls are transparent acrylic. The entire apparatus is raised 50 cm above the floor. Initially, subjects were placed on the center platform of the maze facing an enclosed arm. During the test the mice are allowed to move freely about the maze for 10 min. The percentage of entries into each arm, the percentage of time spent in each arm, and the percentage of time spent in central platform are recorded and these measurements serve as an index of anxiety-like behavior as described by (Komada et al., 2008). After each trial, all arms and the center area were cleaned with 30% ethanol solution, to prevent a bias based on olfactory cues.

2.7. Cytokine immunoassay

The interleukin (L-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) content were determined in ipsilateral cortex homogenate containing bovine serum albumin (BSA 10 mg/ml), 2 mM EGTA, 2 mM EDTA and 0.2 mM PMSF in phosphate buffered saline (PBS 0.1 M, pH 7.4). Cytokine levels were measured using a commercially available ELISA kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer's protocol. The concentration of cytokines was normalized to the protein concentration contained in the samples. The results were expressed in pg/mg of protein.

2.8. Assay of NO_x (NO₂ plus NO₃) as a marker of NO synthesis

For NO_x determination, an aliquot of 100 μ L of ipsilateral homogenates containing 2 mM EGTA, 2 mM EDTA and 0.2 mM PMSF in phosphate buffered saline was added to acetonitrile (96%, HPLC grade). Afterwards, the homogenate was centrifuged at 3000g for 30 min at 4 °C and the supernatant was separated for the analysis of the NO_x content as described by Miranda et al. (2001). The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M) for protein determination by the Bradford method and the concentration of NO_x was normalized to the protein concentration contained in the samples. The results were expressed in nmol of NO_x/mg of protein.

2.9. Evaluation of brain edema by water content

To determine the ipsilateral water content a subset of animals was sacrificed 3 h and 1 day after trauma. The ipsilateral hemispheres were immediately removed. After obtained wet weight (WW) of fresh brain, tissue samples were dried in a desiccating oven at 105 °C for 24 h and weighed to obtain the dry weight (DW). Tissue water content (%) was calculated as (WW–DW)/WW \times 100 according to Zweckberger et al. (2006).

2.10. Measurement of thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

The TBARS content was estimated by the method of Ohkawa et al. (1979). Briefly, the ipsilateral cortex homogenates containing BHT (80 μ M) were incubated in a medium containing 30 μ L cortex homogenate, 20 μ L of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 80 μ L buffered acetic acid (500 mM, pH 3.4), and 150 μ L of 0.8% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was made up to 400 μ L with type I ultrapure water and heated to 95 °C for 60 min in water bath using a glass ball as condenser. The absorbance of each sample was measured in the supernatant at 532 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer (Hitachi Instruments Incorporation, Schaumburg, IL, USA).

2.11. Measurement of protein carbonyl content

The total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995) and adapted for brain tissue by Schneider Oliveira et al. (2004). Briefly, ipsilateral cortex homogenates were adjusted to 759–800 μ g of protein/ml in each

sample and 500 μ L aliquots were mixed with 0.1 ml 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.1 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark environment, 250 μ L denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1 ml heptane (99.5%) and 1 ml ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed under vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Afterwards, the protein isolated from the interface was twice washed with 1 ml ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 500 μ L ml denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank) and total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹, as described by (Levine et al., 1990).

2.12. Na⁺, K⁺-ATPase activity measurement

Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured according to Silva et al. (2013). Briefly, the reaction medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, and 50 μ g protein in the presence or absence of ouabain (1 mM) to a final volume of 350 μ L. The reaction was started by adding adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, reaction was stopped by adding 70 μ L trichloroacetic acid (TCA, 50%). Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow and the Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

2.13. Evaluation of the injured cortical volume

After the elevated plus maze test, the mice were killed for histologic analysis. Under deep anesthesia (ketamine hydrochloride, 200 mg/kg, i.p.) they were transcardially perfused with 100 mL of heparinized saline (1000 UI/ml) followed by 100 mL of formaldehyde (4%) in PBS (0, 1 M), then the brains were carefully removed from the skull. The measurement of lesion volume was performed according to Ziebell et al. (2011) with some modifications. Briefly, six sections from bregma levels –0.5 to –3 mm, spaced 500 μ m apart, were stained with hematoxylin and eosin, and digitally photographed using a stereomicroscope (Olympus BX51) with a digital camera (Olympus DP25). The peripheries of the lesion were traced on each image according Fig. 8B–E by a pathologist with help of a microscope at 4 \times magnification. The area of cortical lesion was calculated using calibrated image analysis software program Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Volumes were calculated using the formula $\Sigma(A_n + A_{n+1}) \times d/2$ where A is the lesioned area in each section and, d is the distance between sections.

2.14. Data analysis

Data were expressed as means \pm S.E.M. or median \pm interquartile range. Data were analyzed by one, two or three way analysis of variance (ANOVA) or by non-parametric tests such as Kruskal–Wallis or Friedman tests depending on the experimental design. *Post-hoc* analyses were performed with the Newman–Keuls test, or Dunn test when appropriate. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Apocynin has no statistically significant effect on neuromotor deficit induced by mLFPI in mice

To assess whether inhibition of NOX₂ by apocynin alters the neurological disabilities resulting from mLFPI, we injected the mice

with vehicle or apocynin (0.05, 0.5 and 5 mg/kg; s.c.) 30 min and 24 h after mLFPI induction and their neuromotor function were tested at time intervals of 3 and 6 h and 1 day (test performed 2 h and 30 min after last drug injection) after trauma induction. The result of this experiment is shown in Fig. 2A. The Friedman test revealed that mLFPI induced neuromotor damage over time [$F(5) = 13.86$; $p < 0.001$]. A trend, although without statistical significance, was noted towards attenuation of the neuroscore deficit in animals treated with TBI/apocynin 0.5 mg/kg and in TBI/apocynin 5 mg/kg in comparison with TBI/vehicle-treated mice. The post hoc analysis performed at each time point is shown in Fig. 2B–D.

3.2. Apocynin post-treatment is effective in reducing the object recognition deficit induced by mLFPI in mice

The effect of different doses of apocynin in ORT is demonstrated in Fig. 3. Our result showed that apocynin 0.05 mg/kg had no effect on memory impairment caused by mLFPI. On the other hand, the dose of 0.5 mg/kg demonstrated only a trend towards reversal of memory deficit, although without statistical significance. However, the statistical analysis also revealed that DI reduction caused by trauma was significantly reversed by Apocynin at the dosage of 5 mg/kg [$F(5, 31) = 4.708$; $p < 0.01$; Fig. 3]. To exclude the effect of locomotor and exploratory disabilities on ORT we performed the open-field test as shown in Table 1. No statistically significant difference was found between the tested groups in crossing [$F(5,31) = 1.271$; $p = 0.314$] or rearing responses [$F(5,31) = 1.708$;

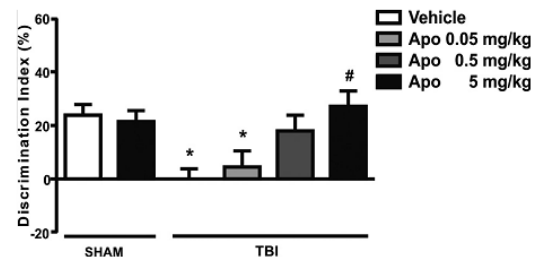


Fig. 3. Effect of apocynin (0.05, 0.5 and 5 mg/kg; s.c.) on recognition memory impairment induced by mLFPI 7 days after injury. Values represent mean \pm S.E.M. for $n = 6-7$ per group. * $P < 0.05$ compared with Sham/vehicle group. # $P < 0.05$ compared with TBI/vehicle group (Newman-Keuls multiple comparison test).

$p = 0.162$). To exclude the effects of anxiety on memory, we analyzed whether apocynin treatments alter anxiogenic like behavioral as shown in Table 2. No significant difference was found between the tested groups in percentage of time spent in open arms [$F(5,31) = 0.3043$; $p = 0.906$], in percentage of number of entries in open arms [$F(5,31) = 0.7371$; $p = 0.601$], in percentage of time spent in enclosed arms [$F(5,31) = 0.8171$; $p = 0.547$], in percentage of number of entries in enclosed arms [$F(5,31) = 0.7371$; $p = 0.601$], in percentage of time spent in the central area [$F(5,31) = 1.489$; $p = 0.2219$].

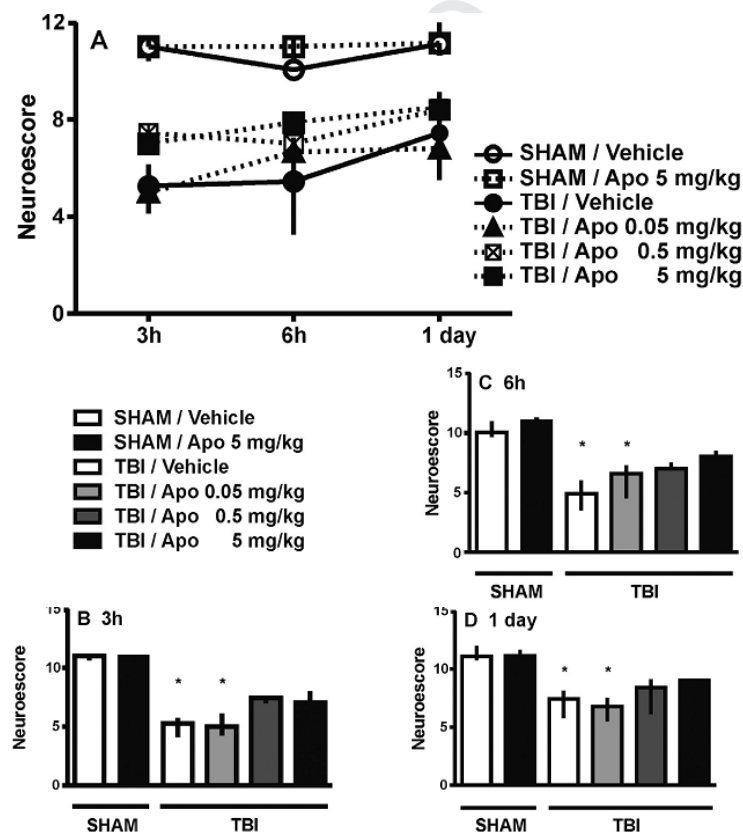


Fig. 2. Effect of apocynin (0.05, 0.5 and 5 mg/kg; s.c.) on neuromotor impairment induced by mLFPI performed 3, 6 h and 1 day after injury. The post hoc analysis performed at each time point is shown in Fig. 2B–D. Values represent median and interquartile for $n = 6-7$ per group. * $P < 0.05$ compared with sham group (Dunn's multiple comparison test).

Table 1
Locomotor and exploratory activity 7 days after mLFPI.

Groups	Crossing	Rearing	N
Sham/vehicle	158.0 ± 20.1	59.4 ± 2.1	6
Sham/Apo 5 mg/kg	150.3 ± 19.5	57.0 ± 5.5	6
TBI/vehicle	182.4 ± 6.1	72.2 ± 6.1	6
TBI/Apo 0.05 mg/kg	194.4 ± 12.9	78.8 ± 4.3	6
TBI/Apo 0.5 mg/kg	146.8 ± 17.6	50.8 ± 12.7	6
TBI/Apo 5 mg/kg	162.6 ± 16.1	60.2 ± 6.4	7

3.3. Apocynin attenuates the acute inflammatory response induced by mLFPI

To evaluate whether the dose of apocynin 5 mg/kg, would also be effective in reducing the mLFPI-induced inflammation in the ipsi lateral cortex, we subjected the mice to the same protocol treatment and investigated the brain edema and IL-1 β , TNF- α and NO $_x$ content in the ipsilateral cortex at time points of 3 h and 1 day after injury. The results shown in Fig. 4, revealed that mLFPI induced an increase in ipsi lateral levels of IL-1 β [$F(1,44) = 28.41$; $p < 0.001$; Fig. 4A], TNF- α [$F(1,44) = 9.62$; $p < 0.01$; Fig. 4B], NO $_x$ [$F(1,44) = 33.66$; $p < 0.001$; Fig. 5C] and water content [$F(1,32) = 62.56$; $p < 0.001$; Fig. 4D]. Notably, the levels of IL-1 β [$F(1,44) = 4.19$; $p < 0.05$] and NO $_x$ [$F(1,44) = 11.67$;

$p < 0.01$] obtained at 1 day were higher than the values obtained at 3 h, but no effect of time on TNF- α levels was found. On the other hand, contrary to that which we expected, the water content found at 3 h was greater than that found at 1 day after injury [$F(1,32) = 7.28$; $p < 0.05$]. The apocynin (5 mg/kg; s.c.) treatment also significantly attenuated mLFPI-induced increase in NO $_x$ content [$F(1,44) = 8.11$; $p < 0.01$; Fig. 4C], reduced the IL-1 β [$F(1,44) = 4.23$; $p < 0.05$; Fig. 4A] and TNF- α content [$F(1,44) = 4.50$; $p < 0.05$; Fig. 4B]. It was interesting to note that, apocynin did not significantly decrease the brain edema resulting from mLFPI [$F(1,32) = 1.32$; $p > 0.05$; Fig 4D].

3.4. Effect of apocynin on oxidative damage

It is well known that NADPH oxidase is a pro-oxidant enzyme, and this is why we decided to evaluate the effects of inhibiting it with apocynin, on the oxidative stress caused by trauma, as is demonstrated in Fig. 5. The statistical analyses showed that mLFPI increased the content of protein carbonyl [$F(1,48) = 17.99$; $p < 0.001$; Fig. 5B], TBARS [$F(1,48) = 3.58$; $p < 0.05$; Fig. 5A], in addition to decreasing Na $^+$, K $^+$ ATPase activity [$F(1,48) = 9.13$; $p < 0.01$; Fig. 5C], an enzyme sensitive to oxidative stress (Lima et al., 2008; Mota et al., 2012; Souza et al., 2009). In contrast with the results of the inflammatory parameters, we did not find any effect of time on

Table 2
Anxiolytic or anxiogenic like behavior 7 days after mLFPI.

Group	% T.O.	% No. E.O.	% T.E.	% No. E.E.	% T.M.	N
Sham/vehicle	10.3 ± 3.2	21.3 ± 3.1	76.3 ± 4.0	78.7 ± 3.1	13.4 ± 2.1	6
Sham/Apo 5 mg/kg	13.1 ± 2.4	28.0 ± 2.8	66.1 ± 2.8	72.0 ± 2.8	20.9 ± 3.6	6
TBI/vehicle	14.0 ± 3.0	28.4 ± 4.8	71.0 ± 4.4	71.6 ± 4.8	15.2 ± 3.1	6
TBI/Apo 0.05 mg/kg	11.3 ± 1.8	17.9 ± 4.0	70.8 ± 2.5	82.1 ± 4.0	17.9 ± 3.2	6
TBI/Apo 0.5 mg/kg	12.4 ± 4.4	26.2 ± 6.7	67.8 ± 4.6	73.8 ± 6.7	19.9 ± 3.9	6
TBI/Apo 5 mg/kg	15.2 ± 4.1	24.9 ± 5.3	72.7 ± 4.5	75.1 ± 5.3	12.1 ± 1.4	7

% T.O. percent of time spent in open arms; % No. E.O. percent of number of entries in open arms; % T.E. percent of time spent in enclosed arms; % No. E.E. percent of number of entries in enclosed arms. % T.M. percent of time spent in the central area.

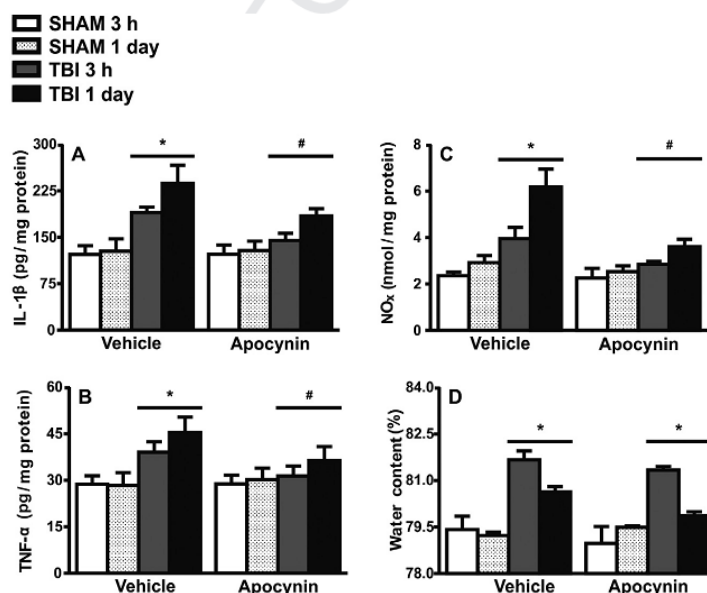


Fig. 4. Apocynin (5 mg/kg, s.c.) attenuates the mLFPI-induced increase in IL-1 β (A), TNF- α (B) and NO $_x$ (C), but have no effects on water content (D) 3 h and 1 day after brain lesion. Values represent mean ± S.E.M. for $n = 5-7$ per group. * $P < 0.05$ compared with Sham/vehicle groups. # $P < 0.05$ compared with TBI/vehicle groups (three way Anova).

Please cite this article in press as: Ferreira, A.P.O., et al. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: Role of inflammatory and oxidative brain damage. Neurochem. Int. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.012>

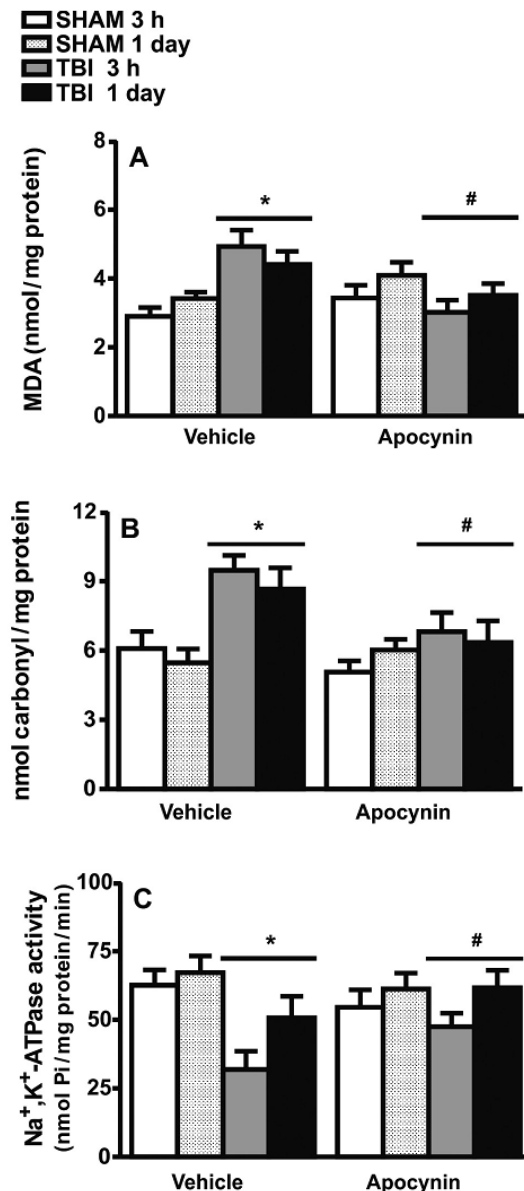


Fig. 5. Apocynin (5 mg/kg, s.c.) attenuates the mLFPI-induced increase in TBARS (A); protein carbonyl content (B) and inhibition of Na⁺, K⁺, ATPase activity (C) 3 and 24 h after neuronal injury. Values represent mean ± S.E.M. for n = 7 per group. *P < 0.05 compared with Sham/vehicle groups. #P < 0.05 compared with TBI/vehicle groups (three way Anova).

TBARS [$F(1,48) = 1.31$; $p > 0.05$] or on protein carbonyl content [$F(1,48) = 0.21$; $p > 0.05$]. However, the inhibition of Na⁺ K⁺ ATPase activity at 3 h was higher than it was at 1 day after trauma [$F(1,48) = 6.18$; $p < 0.05$]. Our data also demonstrated that apocynin (5 mg/kg; s.c.) attenuated the increase in TBARS [$F(1,48) = 16.36$; $p < 0.001$; Fig. 5A] and in protein carbonyl [$F(1,48) = 4.91$; $p < 0.05$; Fig. 5B] induced by mLFPI. This treatment was also able to attenuate Na/K ATPase inhibition, an enzyme sensitive to oxidative stress, induced by mLFPI [$F(1,48) = 5.24$; $p < 0.05$; Fig. 5C].

3.5. Apocynin reduces the cortical lesion volume

It is well known that acute inflammatory and oxidative brain damage contribute to cell death after TBI. Thus, we decided to evaluate whether the Apocynin treatment also reduces the brain lesion volume 7 days after injury. Statistical analyses demonstrated that mLFPI induced a large cortical injury [$F(1,20) = 54.12$; $p < 0.0001$; Fig. 6A], as shown by the representative figures Fig. 6D (TBI/vehicle; 15.2 ± 1.8) vs. Fig. 6B (SHAM/vehicle; 2.8 ± 0.6 mm³). The treatment with Apocynin (5 mg/kg) significantly reduced the lesion volume induced by trauma [$F(1,20) = 4.711$; $p < 0.05$; Fig. 6A] as demonstrated by representative Fig. 6E (TBI/Apocynin; 8.2 ± 1.8 mm³). The treatment with apocynin also decreased the small manipulation lesion present in sham/vehicle mice [$F(1,20) = 10.54$; $p < 0.005$]. The stereological analysis of lesions also demonstrated that mLFPI induced a marked loss of gray matter and a perilesional area with several necrotic neurons. In some cases, there was loss of white matter and moderate inflammatory infiltrate composed primarily of neutrophils and hemorrhage. On the other hand, in the sham animals we observed a focal and slight loss of gray matter characterized by a moderate dimple in the neural parenchyma. Differently from groups TBI/vehicle, the traumatized animals treated with apocynin showed a smaller level of hemorrhage, inflammatory infiltrate and necrosis of neural tissue. Fig. 7E–G shows representative images of other animals that also corroborate the above mentioned stereological analysis. Image 7E demonstrated the hemorrhagic focus in a TBI/vehicle mouse. Image 7F shows a TBI/vehicle mouse that contains neutrophil infiltration. Image 7G corresponds to a TBI/Apocynin animal and demonstrates the protective effects of apocynin, characterized by a minor hemorrhage, inflammatory infiltrate and necrosis of neural tissue (G). These results corroborate the deleterious role of NADPH oxidase in the inflammation and neurodegeneration induced by mLFPI.

4. Discussion

The results presented in this report revealed that treatment with Apocynin, an efficient inhibitor of the NADPH-oxidase complex, promoted protection against mLFPI-induced cognition impairment but had no effect on neuromotor dysfunction. It is important to note that all treatments used in this study did not alter locomotor and/or anxiety-like behavior when analyzed 7 days after mLFPI, suggesting that the effects elicited by apocynin cannot be attributed to locomotor and/or anxiogenic-like behavior. Neurochemical analysis also demonstrated that apocynin administration reduced the cytokine release (IL-1 β and TNF- α) and oxidative damage induced by mLFPI, characterized here by the increase in NO_x, TBARS and protein carbonyl content. Moreover, the protection observed against mLFPI-induced Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition induced by acute apocynin treatment reinforces the idea that the failure of some selected targets, caused by free radical attack, may increase cellular damage in this model of TBI. Thus, our data revealed that mLFPI induced a large cortical injury and that the treatment with apocynin significantly reduced the lesion volume induced by trauma. Although the antibiotic therapy used in this study had anti-inflammatory and anti-apoptotic properties (Romano et al., 2004), the positive results obtained with apocynin cannot be attributed to the antibiotic, since control animals received the same treatment.

In CNS, the NADPH oxidase plays an important role in the normal cellular processes of neurons, such as long-term potentiation (LTP) and hippocampus-dependent memory (Infanger et al., 2006). On the other hand, under pathological conditions, an over-activation of NADPH oxidase contributes significantly to the pathology of TBI via a complex cascade of biochemical events that lead to neuroinflammation, oxidative stress and delayed cell death (Harting et al.,

8

A.P.O. Ferreira et al. / Neurochemistry International xxx (2013) xxx-xxx

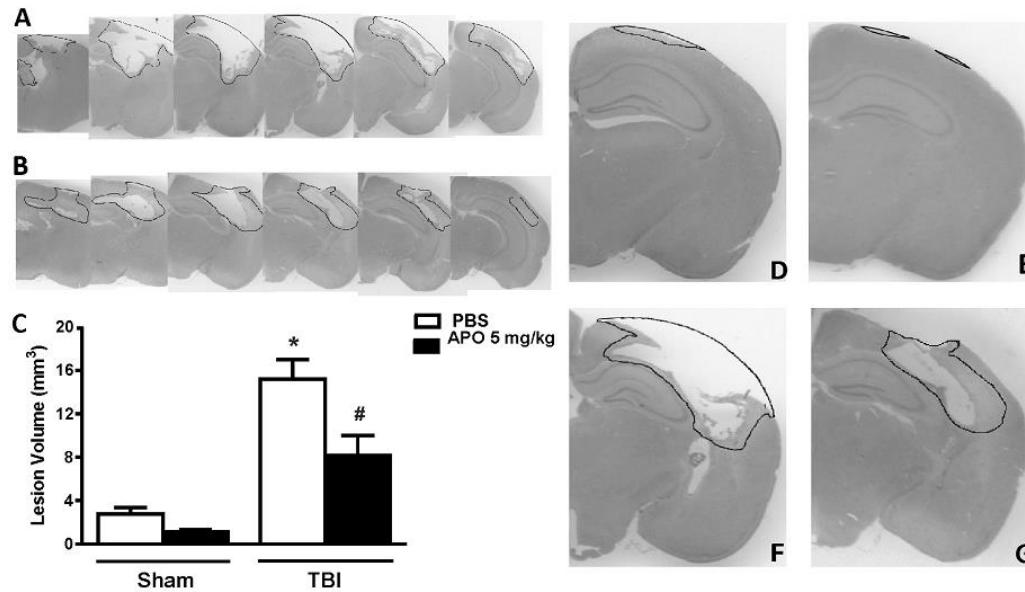


Fig. 6. Apocynin (5 mg/kg, s.c.) attenuates the mLFPI-induced brain lesion. The various analyzed bregma levels to the rostral/caudal lesion distribution of TBI/vehicle (A) and of TBI/Apocynin (B). Effects of apocynin lesion volume (mm³) induced by mLFPI (C). Representative images of groups Sham/vehicle (D) Sham/Apocynin (E) TBI/vehicle (F) and TBI/Apocynin (G). Values represent mean \pm S.E.M. for n = 6 per group. *P < 0.05 compared with Sham/vehicle group. #P < 0.05 compared with TBI/vehicle group (two way Anova).

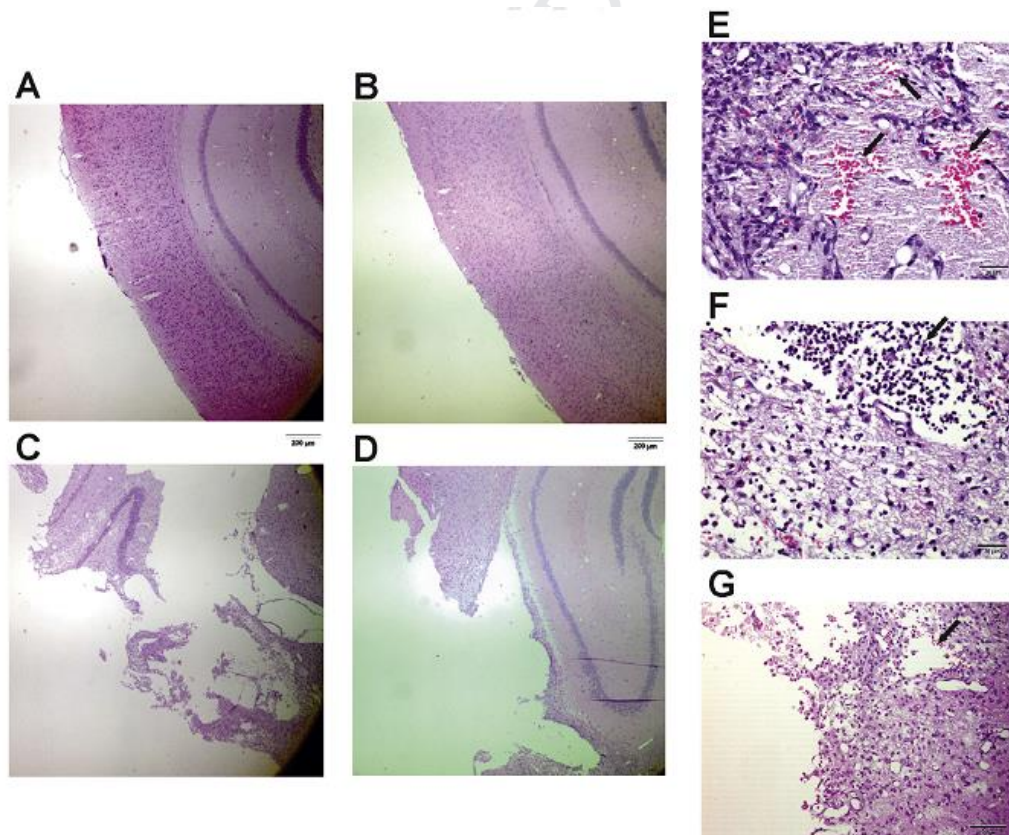


Fig. 7. Effect of apocynin on TBI-induced damage in the cerebral cortex. H&E staining demonstrates the anatomical and cellular differences between groups. Sham/vehicle (A); Sham/Apocynin (B); TBI/vehicle (C); TBI/Apocynin (D); image of a TBI/vehicle mouse showing hemorrhagic focus (E); image of a TBI/vehicle mouse showing neutrophil infiltration in TBI/vehicle mice (F); image of a TBI/Apocynin mouse showing minor hemorrhage, inflammatory infiltrate and necrosis of neural tissue (G).

Please cite this article in press as: Ferreira, A.P.O., et al. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: Role of inflammatory and oxidative brain damage. Neurochem. Int. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.012>

2008; Lotocki et al., 2004). There are experimental evidences that corroborate this sentence, which indicate the effective involvement of NADPH oxidase-dependent ROS generation in the activation of transcription factors, (nuclear factor- κ B (NF- κ B), pro-inflammatory cytokine and prostaglandin E2 production in microglial cells (Yang et al., 2007) as well as the microglial proliferation induced by pro-inflammatory cytokines (Mander et al., 2006). Furthermore, it has been shown that the inhibition of NADPH oxidase-dependent redox signaling by apocynin significantly decreases the iNOS expression in microvascular endothelial cells (Wu et al., 2008), and that gp91^{phox} knockout mice have a reduced up regulation of iNOS after ischemic stroke (Chen et al., 2011). Likewise, our results showed that acute treatment with apocynin was effective against the increase in IL-1 β , TNF- α and NO $_x$ when analyzed at time intervals of 3 and 24 h after brain injury. These data suggest that the reduction in ROS content resulting from NADPH oxidase inhibition affected the intracellular signaling that triggers the production of inflammatory mediators.

In the present study we revealed for the first time that an alteration in the profile of cerebral inflammatory status induced by apocynin limits long-term secondary degeneration, here characterized by cognitive impairment. The apocynin treatment also protected against mLFPI-induced protein carbonylation, increase in TBARS and Na⁺, K⁺-ATPase inhibition. Considering that the Na⁺, K⁺-ATPase enzyme is especially sensitive to oxidative stress (Lima et al., 2009, 2008; Souza et al., 2009) and its inhibition induces spatial learning deficits (Zhan et al., 2004) it is possible that NADPH oxidase ROS production is involved in the decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity and thereby contributes to later cognitive deficit elicited by mLFPI.

It has long been known that the Na⁺, K⁺-ATPase activity is particularly sensitive to reactive species, which alter plasma membrane lipid composition (Jamme et al., 1995) and the redox state of regulatory sulfhydryl groups (Morel et al., 1998). In this context, both oxidative and nitrosative stress induce protein carbonylation (Dean et al., 1997) which is related to increased susceptibility to proteolysis and marked impairment of protein functionality (Dalle-Donne et al., 2006). From the biochemical point of view, the most important consequence of oxidative modification is that Na⁺, K⁺-ATPase molecules have lost the ability to interact with one another, decreasing oligomeric structure formation and leading to subsequent suppression of the rate of hydrolysis (Dobrota et al., 1999). Thus, the effective protection exerted by apocynin against mLFPI-induced Na⁺, K⁺-ATPase inhibition provides a possible mechanism by which the early blockade of NADPH oxidase prevents the progression of secondary brain damage. Corroborating this hypothesis, we performed a histological analysis 7 days post trauma (the time in which memory deficits were developed). Our experimental findings showed that mLFPI induced neural damage here characterized by an increase in lesion volume, and that the treatment with apocynin was effective in reducing lesion volume when analyzed 7 days after injury. The beneficial effects of this drug were also observed on the small manipulation lesion present in sham animals, reinforcing the protective action of this drug on general brain injuries. These results corroborate those of previous studies that have shown the significant role of NADPH oxidase in ROS generation, oxidative stress damage and neuronal cell death following TBI (Choi et al., 2012). Furthermore, the ability of apocynin to reduce neuronal cell death, neurological impairment and mortality in the stroke studies reinforces the assumption that the beneficial effects of Apocynin are especially due to the inhibition of NADPH oxidase (Jackman et al., 2009).

It is interesting to note that we did not verify any protective effect of apocynin on brain water content or against neuromotor disability induced by mLFPI. The absence of beneficial results with treatment with apocynin in brain edema could be indicative that

NADPH oxidase activity is not involved in the development of brain edema induced by TBI. Although, there are experimental findings demonstrating that apocynin (5 mg/kg; i.p.) and gp91ds-tat treatment (another NADPH oxidase inhibitor) reduces brain edema induced by cold brain injury and controlled cortical impact, respectively (Jinnouchi et al., 2007; Zhang et al., 2012) our results are in agreement with other previous studies that did not show any reduction in brain water content with pre- or post-injury treatments with apocynin in different brain injury models (Jackman et al., 2009; Lo et al., 2007; Tang et al., 2008). One possible reason for these discrepant results is the low doses used in present study and the different methodologies used. Therefore, further studies are necessary to elucidate the involvement of NADPH oxidase in the development of brain edema after TBI. The results presented in this report also revealed that Apocynin treatment did not alter transient motor dysfunction induced by mLFPI suggesting that in this trauma model, the NADPH oxidase system is pathologically relevant especially at more advanced stages when degenerative processes prevail. It is important to note that role of the enzyme NADPH oxidase in the development of neuromotor deficit induced by brain injury continues to be controversial. While some authors have suggested that apocynin shows beneficial effects when administered before ischemia (Jackman et al., 2009; Tang et al., 2008) other studies obtained with gp91^{phox} knockout mice have demonstrated a harmful role (Tang et al., 2005) or no involvement of this enzyme in neuromotor damage (Liu et al., 2007). In a model of surgically-induced brain injury, the gp91^{phox} knockout animals, but not the apocynin-treated mice demonstrated improved neurological scores (Lo et al., 2007). Conversely, in another model of traumatic brain injury (controlled cortical injury) the authors obtained improvements with apocynin (5 mg/kg; i.p) treatment in neuromotor deficit and only a trend toward improvements in spatial learning (Loane et al., 2013). Although the reason for these disagreements cannot be established, the differences between experimental models, as well as diversity of treatment protocols (low doses, different time intervals of evaluation and different routes of administration) may determine these contradictions.

5. Conclusions

In summary, in the present study we showed that a single episode of mLFPI induced neurological dysfunction characterized by early neuromotor dysfunction, neuroinflammation, oxidative stress generation and Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition. These modifications induced by mLFPI were followed by cognitive impairment and brain lesion when analyzed 7 days after injury. Our data also revealed that early treatment with Apocynin reduced secondary brain damage and neurological deficits, here characterized by a reduction in recognition memory. Thus, the present study indicates that post injury treatment with specific NADPH oxidase inhibitors, such as apocynin, may provide a new therapeutic approach to the control of neurological disabilities induced by TBI.

Acknowledgments

The present study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (Brazil). Ferreira J. is the recipient of CNPq fellowships, Grant numbers 301552/2007-0. Royes L.F.F. is recipient of CNPq/FAPERGS fellowships, Grant numbers 11/2082-4. The funding sources were not involved in the study design, data collection, and analysis, interpretation of data and in the writing of the report.

References

- Arun, P., Abu-Taleb, R., Oguntayo, S., Wang, Y., Vallyaveetil, M., Long, J., Nambiar, M.P., 2013. Acute mitochondrial dysfunction after blast exposure: potential role of mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase. *J. Neurotrauma*.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Carbonell, W.S., Maris, D.O., McCall, T., Grady, M.S., 1998. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J. Neurotrauma* 15, 217–229.
- Chen, H., Kim, G.S., Okami, N., Narasimhan, P., Chan, P.H., 2011. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation. *Neurobiol. Dis.* 42, 341–348.
- Choi, B.Y., Jang, B.G., Kim, J.H., Lee, B.E., Sohn, M., Song, H.K., Suh, S.W., 2012. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. *Brain Res.* 1481, 49–58.
- Clausen, F., Lundqvist, H., Ekmark, S., Lewen, A., Ebendal, T., Hillered, L., 2004. Oxygen free radical-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis-like cell death after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 21, 1168–1182.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell Mol. Med.* 10, 389–406.
- Davis, A.E., 2000. Mechanisms of traumatic brain injury: biomechanical, structural and cellular considerations. *Crit. Care Nurs. Q.* 23, 1–13.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324 (Pt. 1), 1–18.
- Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurella, E.G., Boldyrev, A.A., 1999. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19, 141–149.
- Dohi, K., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Yofu, S., Satoh, K., Miyamoto, K., Song, D., Tsunawaki, S., Shioda, S., Aruga, T., 2010. Gp91phox (NOX₂) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* 7, 41.
- Harting, M.T., Jimenez, F., Adams, S.D., Mercer, D.W., Cox Jr., C.S., 2008. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: implications for cellular therapy. *Surgery* 144, 803–813.
- Hayashi, T., Juliet, P.A., Kano-Hayashi, H., Tsunekawa, T., Dingqunfang, D., Sumi, D., Matsui-Hirai, H., Fukatsu, A., Iguchi, A., 2005. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes. Metab.* 7, 334–343.
- Hosseini, A.H., Lifshitz, J., 2009. Brain injury forces of moderate magnitude elicit the fencing response. *Med. Sci. Sports Exerc.* 41, 1687–1697.
- Infanger, D.W., Sharma, R.V., Davissou, R.L., 2006. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1583–1596.
- Jackman, K.A., Miller, A.A., De Silva, T.M., Crack, P.J., Drummond, G.R., Sobey, C.G., 2009. Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox₂-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 156, 680–688.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *NeuroReport* 7, 333–337.
- Jinnouchi, Y., Yamagishi, S., Matsui, T., Takenaka, K., Yoshida, Y., Nakamura, K., Ueda, S., Imaizumi, T., 2007. Administration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits cold injury-induced brain edema in mice. *Brain Res.* 1167, 92–100.
- Kahles, T., Brandes, R.P., 2012. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2345–2363.
- Komada, M., Takao, K., Miyakawa, T., 2008. Elevated plus maze for mice. *J. Vis. Exp.*
- Lambert, A.J., Brand, M.D., 2009. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol. Biol.* 554, 165–181.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Lewen, A., Matz, P., Chan, P.H., 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* 17, 871–890.
- 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., Figuera, M.R., Mello, C.F., Royes, L.F., 2009. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res.* 1279, 147–155.
- Lima, F.D., Souza, M.A., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Martignoni, F.V., Hoffmann, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F., Oliveira, M.S., de Mello, C.F., 2008. Na⁺, K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav. Brain Res.* 193, 306–310.
- Liu, S., Tang, J., Ostrowski, R.P., Titova, E., Monroe, C., Chen, W., Lo, W., Martin, R., Zhang, J.H., 2007. Oxidative stress after subarachnoid hemorrhage in gp91phox knockout mice. *Can. J. Neurol. Sci.* 34, 356–361.
- Lo, W., Bravo, T., Jadhav, V., Titova, E., Zhang, J.H., Tang, J., 2007. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcomes in surgically-induced brain injury. *Neurosci. Lett.* 414, 228–232.
- Loane, D.J., Stoica, B.A., Byrnes, K.R., Jeong, W., Faden, A.I., 2013. Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 30, 403–412.
- Lotocki, G., Alonso, O.F., Dietrich, W.D., Keane, R.W., 2004. Tumor necrosis factor receptor 1 and its signaling intermediates are recruited to lipid rafts in the traumatized brain. *J. Neurosci.* 24, 11010–11016.
- Lotocki, G., de Rivero Vaccari, J.P., Perez, E.R., Sanchez-Molano, J., Furonos-Alonso, O., Bramlett, H.M., Dietrich, W.D., 2009. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J. Neurotrauma* 26, 1123–1134.
- Mander, P.K., Jekabsone, A., Brown, G.C., 2006. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J. Immunol.* 176, 1046–1052.
- Marklund, N., Clausen, F., McIntosh, T.K., Hillered, L., 2001. Free radical scavenger posttreatment improves functional and morphological outcome after fluid percussion injury in the rat. *J. Neurotrauma* 18, 821–832.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.
- Morehead, M., Bartus, R.T., Dean, R.L., Mlotke, J.A., Murphy, S., Sall, J., Goldman, H., 1994. Histopathologic consequences of moderate concussion in an animal model: correlations with duration of unconsciousness. *J. Neurotrauma* 11, 657–667.
- Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Priou, A., Huguette, F., 1998. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 33, 531–540.
- Mota, B.C., Pereira, L., Souza, M.A., Silva, L.F., Magni, D.V., Ferreira, A.P., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Mazzardo-Martins, L., Silva, M.D., Santos, A.R., Ferreira, J., Figuera, M.R., Royes, L.F., 2012. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotox. Res.* 21, 175–184.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Prins, M.L., 2008. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1–16.
- Pun, P.B., Lu, J., Mochhala, S., 2009. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radical Res.* 43, 348–364.
- Raghupathi, R., Fernandez, S.C., Murai, H., Trusko, S.P., Scott, R.W., Nishioka, W.K., McIntosh, T.K., 1998. BCL-2 overexpression attenuates cortical cell loss after traumatic brain injury in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1259–1269.
- Romano, C.C., Benedetto, N., Catania, M.R., Rizzo, A., Galle, F., Losi, E., Hasty, D.L., Rossano, F., 2004. Commonly used antibiotics induce expression of Hsp 27 and Hsp 60 and protect human lymphocytes from apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 4, 1067–1073.
- Schneider Oliveira, M., Flavia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Figuera, M., de Carvalho Myskiw, J., Gindri Fiorenza, N., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Silva, L.F., Hoffmann, M.S., Gerbatin, R., Fiorin, F., Dobrachinski, F., Mota, B.C., Wouters, A.T., Soares, F.A., Pavarini, S.P., Figuera, M.R., Royes, L.F., 2013. Treadmill exercise protects against pentylentetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*.
- Singh, P., 2003. Missile injuries of the brain: results of less aggressive surgery. *Neuro India* 51, 215–219.
- Solaroglu, I., Okutan, O., Kaptanoglu, E., Beskonakli, E., Kilinc, K., 2005. Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats. *J. Clin. Neurosci.: Off. J. Neurosurgical Soc. Australasia* 12, 273–275.
- Song, S.X., Gao, J.L., Wang, K.J., Li, R., Tian, Y.X., Wei, J.Q., Cui, J.Z., 2012. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. *Mol. Med. Rep.*
- Souza, M.A., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Dalla Corte, L.C., Silva, L.F., Retamoso, L.T., Dalla Corte, C.L., Puntel, G.O., de Avila, D.S., Soares, F.A., Figuera, M.R., de Mello, C.F., Royes, L.F., 2009. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50, 811–823.
- Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., Verhoeven, A.J., 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 95–102.
- Tang, J., Liu, J., Zhou, C., Ostanin, D., Grisham, M.B., Neil Granger, D., Zhang, J.H., 2005. Role of NADPH oxidase in the brain injury of intracerebral hemorrhage. *J. Neurochem.* 94, 1342–1350.
- Tang, X.N., Cairns, B., Cairns, N., Yenari, M.A., 2008. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience* 154, 556–562.
- Toklu, H.Z., Hakan, T., Biber, N., Solakoglu, S., Ogun, A.V., Sener, G., 2009. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radical Res.* 43, 658–667.
- Van den Worm, E., Beukelman, C.J., Van den Berg, A.J., Kroes, B.H., Labadie, R.P., Van Dijk, H., 2001. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 433, 225–230.
- Wu, F., Tymk, K., Wilson, J.X., 2008. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 217, 207–214.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Yang, C.S., Lee, H.M., Lee, J.Y., Kim, J.A., Lee, S.J., Shin, D.M., Lee, Y.H., Lee, D.S., El-Benna, J., Jo, E.K., 2007. Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J. Neuroinflammation* 4, 27.

Please cite this article in press as: Ferreira, A.P.O., et al. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: Role of inflammatory and oxidative brain damage. *Neurochem. Int.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.012>

- Zhan, H., Tada, T., Nakazato, F., Tanaka, Y., Hongo, K., 2004. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. *Neurol. Res.* 26, 35–40.
- Zhang, Q.G., Laird, M.D., Han, D., Nguyen, K., Scott, E., Dong, Y., Dhandapani, K.M., Brann, D.W., 2012. Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. *PLoS ONE* 7, e34504.
- Ziebell, J.M., Bye, N., Semple, B.D., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2011. Attenuated neurological deficit, cell death and lesion volume in Fas-mutant mice is associated with altered neuroinflammation following traumatic brain injury. *Brain Res.* 1414, 94–105.
- Zweckberger, K., Eros, C., Zimmermann, R., Kim, S.W., Engel, D., Plesnila, N., 2006. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 23, 1083–1093.

UNCORRECTED PROOF

4.1 DISCUSSÃO

O sistema caliceína-cininas representa uma cascata que, quando ativada, desencadeia a liberação de cininas. Sabendo-se que todos os componentes do sistema caliceína-cininas estão amplamente expressos no SNC (FRANCEL, 1992; WALKER, PERKINS e DRAY, 1995; THORNTON et al., 2010), espera-se que, após a lesão cerebral, as cininas (BK e a KD) sejam geradas a partir de seus respectivos cininogênios (THORNTON et al., 2010). Nesse sentido, os resultados experimentais aqui apresentados apoiam a proposição acima, visto que o trauma moderado induzido por PFL aumentou o conteúdo de cininas 3 horas, 6 horas e 1 dia após a lesão. Tais resultados orientaram a escolha dos horários para a intervenção farmacológica anti-cininas. Desse modo, após efetuar duas administrações subcutâneas (30 min e 24 horas após lesão) de antagonistas dos receptores B_1 e B_2 , seus efeitos foram avaliados sobre os parâmetros comportamentais (neuroscore e memória de reconhecimento de objetos), de inflamação e de estresse oxidativo. As análises bioquímicas foram realizadas 2 horas e 30 minutos após cada tratamento. Já os testes comportamentais foram executados em tempos escolhidos a partir de curvas de tempo. Os resultados das referidas curvas apontaram os tempos de 3 horas, 6 horas e 1 dia após a lesão como melhores para o teste de neuroscore, enquanto 7 dias após a lesão mostrou-se um bom tempo para o teste de memória.

Desta forma, o presente trabalho demonstrou que o HOE-140 reduziu o aumento dos níveis de citocinas ($IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$) causado pelo TCE induzido por PFL quando analisados 3 horas e 1 dia após a lesão. A literatura atual suporta o efeito anti-inflamatório do bloqueio farmacológico do receptor B_2 . SU et al. (2009) verificaram que o tratamento com bradyzide ou SSR240612 (ambos antagonistas B_2R), semelhantemente, atenua o aumento de $TNF-\alpha$ e PGE_2 após lesão cerebral isquêmica. O LF16-0687Ms, outro antagonista B_2R , também diminui a síntese de prostaglandina E_2 após trauma induzido por modelo de LCF (KAPLANSKI et al., 2003).

Da mesma forma, verificou-se que o trauma por PFL aumentou o conteúdo de água no hemisfério ipsilateral 3 horas e 1 dia após a lesão, coincidindo com aumento do conteúdo de cininas. Em concordância com a literatura atual (STOVER, DOHSE e UNTERBERG, 2000; GORLACH et al., 2001; PLESNILA et al., 2001; HELLAL et al., 2003; KAPLANSKI et al., 2003; IVASHKOVA et al., 2006; TRABOLD et al., 2010), o bloqueio do receptor B_2 foi efetivo em reduzir o edema cerebral induzido pelo trauma. Assim, os nossos achados

reforçam o envolvimento das cininas no edema cerebral pós-traumático e sugerem um importante papel para o B₂R nesse problema associado ao TCE.

O modelo de TCE experimental utilizado aumentou os níveis de NO_x no córtex ipsilateral dos animais lesionados. Sabe-se que a produção excessiva de NO induz a nitração de proteínas, exacerbação da lesão cerebral e déficit cognitivo em diversos modelos experimentais de TCE (WADA, CHATZIPANTELI, BUSTO, et al., 1998; WADA, CHATZIPANTELI, KRAYDIEH, et al., 1998; WADA et al., 1999; LU et al., 2003; GAHM et al., 2006). Dessa forma, a redução nos níveis de NO_x obtida com o tratamento com HOE-140 reforça o papel danoso do B₂R na fisiopatologia do TCE em camundongos.

Outro importante achado foi a constatação de que a lesão traumática ativa a enzima NADPH-oxidase. Esse aumento deve-se, muito provavelmente, ao estímulo do B₂R, tendo em vista a ação inibidora do HOE-140 sobre a referida enzima. De fato, a ação estimulante da bradicinina sobre a produção de EROs e atividade da NADPH-oxidase em diferentes tipos celulares (GREENE, VELARDE e JAFFA, 2000; LIU et al., 2009; HSIEH et al., 2010; LIN et al., 2012), já é conhecida na literatura. Além disso, os achados aqui relatados indicam que a inibição da NADPH-oxidase pode resultar em uma diminuição do estresse oxidativo induzido pelo trauma. Isso porque o tratamento com HOE-140 também atenuou a carbonilação de proteínas, o acúmulo de TBARS e protegeu contra a inibição da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase. Cabe lembrar que essa é uma enzima importante para a função neuronal e altamente sensível ao dano oxidativo. Além disso, a perda das propriedades eletrônicas dos dendritos, causada pelo mau funcionamento da Na⁺, K⁺ ATPase bloqueia o processamento do sinal dentro do neurônio, destruindo o processo de formação da memória (DICKY et al., 2005). Tal fato indica um possível papel para essa enzima no prejuízo de memória de reconhecimento de objetos. Embora o efeito do HOE-140 sobre a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase tenha sido avaliado apenas 3 horas e 1 dia após a lesão, o mesmo tratamento preveniu o desenvolvimento do déficit de memória de reconhecimento de objeto quando analisado 7 dias após a lesão.

Evidências experimentais recentes apoiam o envolvimento de muitas das alterações bioquímicas descritas aqui em problemas de memória resultantes de lesões cerebrais. Trabalhos têm mostrado que o bloqueio precoce de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α e IL-1 β , melhora a memória em testes realizados após o trauma (SANDERSON et al., 1999; LONGHI et al., 2008; CLAUSEN et al., 2009; BARATZ et al., 2011). Nessa mesma linha de raciocínio, roedores tratados com substâncias antioxidantes têm menor déficit de memória quando comparados com os controles em modelos de trauma por ICC ou por PFL (ABDEL

BAKI et al., 2010; AIGUO, ZHE e GOMEZ-PINILLA, 2010; SINGLETON et al., 2010), atestando, assim, o papel do estresse oxidativo na deterioração da memória associada ao TCE.

Também é possível especular que a soma das ações protetivas obtidas com HOE-140 reduz a progressão do dano secundário, resultando em uma menor lesão cerebral, cuja consequência poderia ser um melhor desempenho cognitivo. De fato, vários estudos evidenciam uma relação entre a piora da memória e a lesão neural em diferentes espécies de roedores submetidas ao trauma (HICKS et al., 1993; FOX et al., 1998; MARKLUND et al., 2001; CLAUSEN et al., 2005; HAN et al., 2009; LEVY et al., 2009; ABDEL BAKI et al., 2010; AIGUO, ZHE e GOMEZ-PINILLA, 2010; SINGLETON et al., 2010). Nesse contexto, os nossos resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com HOE-140 foi eficaz na redução do volume de lesão cortical induzida pelo trauma. Esse achado confirma estudos prévios que já verificaram um papel protetor para o antagonismo do B₂R na neurodegeneração induzida por diferentes modelos de lesão cerebral (GROGER et al., 2005; KLASNER et al., 2006; TRABOLD et al., 2010; YANG et al., 2013).

Considerando que o tratamento com HOE-140 protegeu do aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase após a lesão, postulou-se que o efeito protetor obtido com o antagonista do B₂R poderia dever-se à sua ação sobre a referida enzima. Na tentativa de provar essa possibilidade, foi realizado um segundo estudo utilizando a apocinina, um conhecido inibidor da NADPH-oxidase.

Os resultados do segundo trabalho apoiam a hipótese levantada, pois demonstraram que o tratamento com apocinina apresenta efeitos bastante semelhantes aos obtidos com o HOE-140. Analisando os resultados do referido trabalho, vemos que a apocinina atenuou o déficit de memória de reconhecimento de objetos, reduziu o aumento da carbonilação de proteínas, o conteúdo de TBARS e a inibição da Na⁺, K⁺ ATPase induzidos pelo TCE. Esses resultados encontram-se de acordo com a literatura, pois alguns trabalhos já demonstraram uma diminuição do estresse oxidativo com o tratamento com apocinina em diferentes modelos de lesão cerebral (CHOI, B. Y. et al., 2012; CHOI, S. H. et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O tratamento com apocinina também atenuou o aumento dos níveis de IL-1 β , TNF- α e NOx causado pelo trauma por PFL. De fato, há um vasto conjunto de resultados experimentais evidenciando o envolvimento das espécies reativas na ativação do NF- κ B e das MAPKs, os quais sabidamente aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios (HADDAD, 2002; HADDAD e LAND, 2002; HSU e WEN, 2002; RYAN et al., 2004; RAHMAN e ADCOCK, 2006). Também tem sido demonstrado que a atividade da NADPH-oxidase está envolvida na ativação das MAPKs e do NF- κ B, no aumento mediadores pró-inflamatórios

(YANG et al., 2007), e na proliferação da micróglia induzida por citocinas (MANDER, JEKABSONE e BROWN, 2006). A literatura dispõe ainda de trabalhos que relatam uma relação entre a atividade de NADPH-oxidase e a produção de NO em diferentes tipos de celulares. Esses estudos demonstram que a inibição da sinalização redox dependente da NADPH-oxidase pela apocinina diminui significativamente a expressão de iNOS em células endoteliais (WU, TYML e WILSON, 2008) e em modelo de pleurisia em camundongos (IMPELLIZZERI et al., 2011). Também foi demonstrado que camundongos knockout gp91phox tem uma redução da expressão da iNOS após acidente vascular cerebral isquêmico (CHEN et al., 2011). Assim é plausível que a inibição da NADPH-oxidase causada pelo HOE-140 e pela apocinina afete a sinalização intracelular que desencadeia a produção de mediadores inflamatórios, resultando em uma menor resposta inflamatória.

Da mesma forma que o HOE-140, o tratamento com a apocinina preveniu o déficit de memória induzido pelo trauma sete dias após a lesão. O presente resultado confirma trabalhos anteriores que mostraram que a inibição da NADPH-oxidase é protetora contra o prejuízo de memória dependente de hipocampo em animais com isquemia cerebral e TCE (RAZ et al., 2010; SHEN et al., 2011; SONG et al., 2012). Sabe-se que as EROs estão envolvidas na sinalização pró-inflamatória e que, mediadores pro-inflamatórios medeiam o desenvolvimento do déficit cognitivo induzido por TCE. Ademais, ao se levar em conta que a lesão neural tem uma relação com a piora da memória em roedores, torna-se possível que a menor lesão cerebral obtida com tratamento com a apocinina resulte em um déficit de memória reduzido. Em apoio a essa hipótese, foi demonstrado que o tratamento com apocinina reduziu também o volume da lesão cerebral induzido por trauma semelhantemente ao tratamento com HOE-140. Assim, pode-se dizer que o tratamento com apocinina diminuiu a produção de EROs e a resposta inflamatória, resultando em uma menor lesão neural e conseqüentemente menor prejuízo de memória. Cabe ainda salientar que o tratamento com apocinina protegeu contra a inibição da enzima Na^+ , K^+ -ATPase. Tendo em vista o envolvimento de Na^+ , K^+ -ATPase nos mecanismos de plasticidade sináptica como a potenciação a longo prazo, um prejuízo no seu funcionamento via geração de EROs pode estar relacionado a um déficit de memória após o TCE.

Por outro lado, o tratamento com apocinina não obteve resultados significantes sobre o edema cerebral embora o tratamento com HOE o tenha. As causas para essa diferença de resultados não foram estabelecidas neste trabalho. Porém, uma possível explicação seria uma ação do B_2R , independente da atividade da NADPH-oxidase, no desenvolvimento do edema cerebral induzido por TCE. Esses achados corroboram outros estudos, que não verificaram

redução do edema com tratamento com apocinina realizados pré ou pós lesão em diferentes modelos de dano cerebral (LO et al., 2007; TANG et al., 2008; JACKMAN et al., 2009). Entretanto, também existem resultados experimentais demonstrando que o tratamento com apocinina (5 mg / kg, i.p.) e com gp9 ds tat (outro inibidor da NADPH-oxidase) reduzem o edema induzido por lesão cerebral criogênica ou por impacto cortical controlado (JINNOUCHI et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Assim, para melhor entender o envolvimento da NADPH-oxidase no desenvolvimento de edema cerebral após TCE, mais estudos são necessários.

Outro parâmetro comportamental avaliado foi a função neuromotora. A deterioração da função motora é uma conhecida consequência do TCE tanto em humanos, quanto em modelos experimentais de ratos e camundongos. Assim, um claro, porém transitório, déficit motor foi observado nas primeiras 24 horas após o trauma. Entretanto, nenhuma das drogas testadas (HOE-140, DAL-BK, Apocinina) mostrou efeitos significativamente protetores sobre a disfunção motora, embora, uma tendência sem significância estatística tenha sido vista com o tratamento com Apocinina (5 mg/kg). Essa pequena diferença entre os resultados alcançados com HOE-140 e a apocinina pode ser um indício de que a melhora na resposta motora exija uma ampla inibição da atividade da NADPH-oxidase após o trauma, a qual não pôde ser obtida com as doses testadas de HOE-140 e apocinina.

Portanto, levando-se em conta a ocorrência dos seguintes fatores: a existência de uma ligação entre o estímulo do B₂R e o aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase em culturas de astrócitos (LIU et al., 2009; HSIEH et al., 2010; AKITA e OKADA, 2011; LIN et al., 2012); a inibição da NADPH-oxidase causada pelo antagonista do B₂R; e a semelhança entre os resultados obtidos com o HOE-140 e com a apocinina, pode-se sugerir que os efeitos danosos do B₂R envolvem pelo menos em parte o aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase.

Corroborando a referida conclusão, um trabalho recente demonstrou que a estimulação de astrócitos com bradicinina leva à produção de múltiplos mediadores inflamatórios, cujo contato com neurônios induziu a apoptose dos mesmos. Os efeitos da bradicinina foram revertidos na presença do antioxidante N-acetilcisteína (YANG et al., 2013). Assim, sugere-se que tanto B₂R quanto a enzima NADPH-oxidase estão envolvidas no dano secundário associado ao TCE experimental, embora mais estudos nessa área ainda sejam necessários para pavimentar essa proposição.

CONCLUSÕES

5.1. CAPÍTULO I:

A) A lesão cerebral induzida por PFL causa um prejuízo motor transitório que perdura por até 1 dia após a lesão, enquanto o déficit de memória se estabelece apenas 7 dias após lesão;

B) O TCE moderado induzido por PFL causa um aumento nos níveis de cininas que se estabelece nos tempos de 3 horas, 6 horas e 1 dia após a lesão, indicando que os melhores momentos para o bloqueio farmacológico dos receptores da BK concentram-se nas primeiras 24 horas após o trauma;

C) O antagonismo farmacológico do B₂R reduz os efeitos deletérios das cininas sobre déficit cognitivo causado pelo TCE moderado induzido por PFL, entretanto nenhum dos antagonistas testados parece exercer efeitos na disfunção motora causada por essa lesão cerebral;

D) O antagonismo farmacológico do B₂R reduz a neuroinflamação (liberação de IL-1 β , TNF- α , NO e formação de edema) desencadeada pelo TCE moderado induzido por PFL em camundongos;

E) O antagonismo farmacológico do B₂R reduz o aumento da atividade da NADPH-oxidase desencadeada pela pelo TCE moderado induzido por PFL em camundongos;

F) O antagonismo farmacológico do B₂R reduz o aumento do estresse oxidativo (aumento do conteúdo de proteínas carboniladas, de TBARS e diminuição da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase) causado pelo TCE moderado por PFL em camundongos;

G) O antagonismo farmacológico do B₂R reduz a progressão da lesão cortical (volume de lesão) causada pelo TCE moderado induzido por PFL em camundongos.

5.2. CAPÍTULO II:

A) A inibição farmacológica da NADPH-oxidase com a apocinina reduz o déficit de memória, porém parece não participar significativamente do déficit motor causado pelo TCE induzido por PFL em camundongos;

B) A inibição farmacológica da NADPH-oxidase com a apocinina reduz a neuroinflamação (liberação de IL-1 β , TNF- α , NO) causada pelo TCE induzido por PFL em camundongos, porém parece não participar da formação do edema cerebral desencadeado por essa lesão;

C) A inibição farmacológica da NADPH-oxidase com a apocinina reduz o estresse oxidativo (conteúdo de proteínas carboniladas, TBARS e inibição da Na⁺, K⁺ ATPase) causado pelo TCE induzido por PFL em camundongos;

D) A inibição farmacológica da NADPH-oxidase com a apocinina reduz a progressão da lesão cortical (volume de lesão) causada pelo TCE induzido por PFL em camundongos.

5.3. CONCLUSÃO FINAL

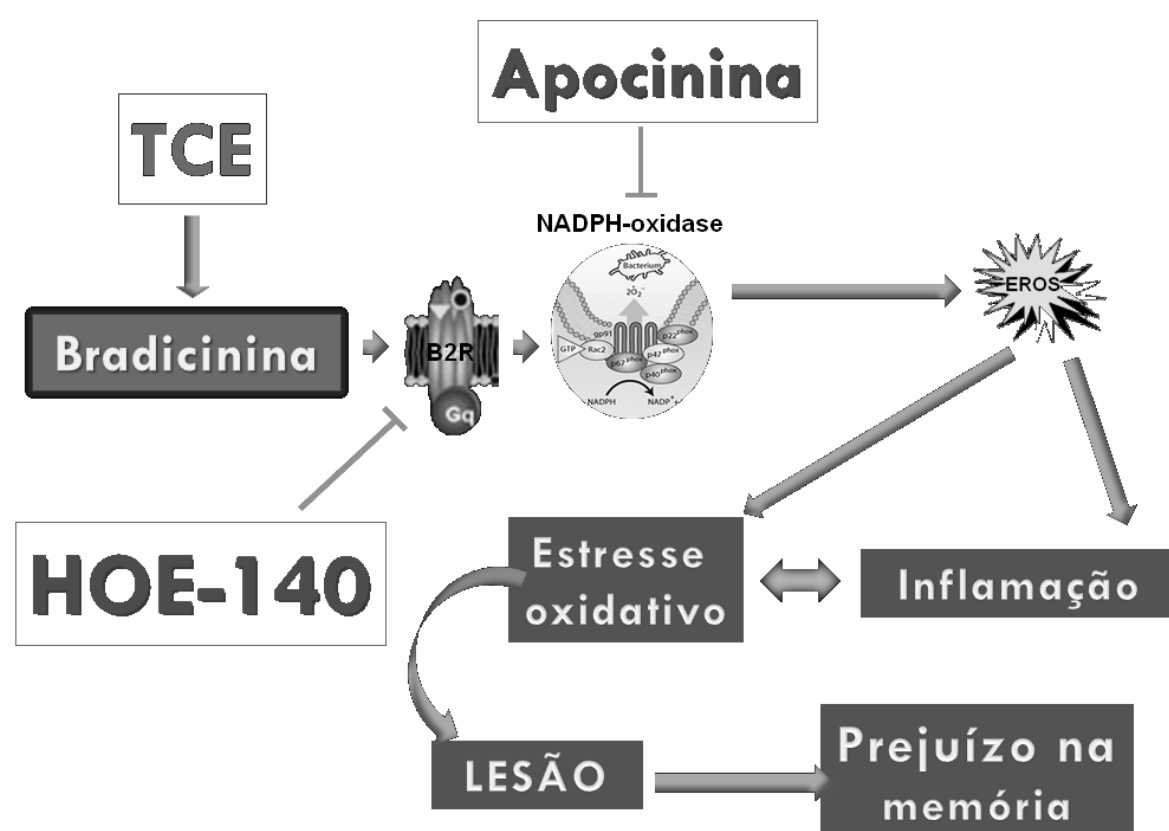


Figura 8 – Representação esquemática da conclusão da presente Tese. A estimulação do B₂R ativa a NADPH-oxidase que, ao produzir EROs, induz estresse oxidativo e expande a resposta inflamatória. A soma dessas ações amplifica a lesão do parênquima neural que se repercute em um prejuízo de memória.

O modelo experimental de TCE moderado induzido por PFL causa a produção de cininas em camundongos. Essas, por ação do B₂R e possivelmente da NADPH-oxidase, induzem neuroinflamação e estresse oxidativo. Os referidos fatores podem estar envolvidos na progressão da lesão cortical a qual pode repercutir na deterioração da memória de reconhecimento de objetos. Assim, o B₂R e a NADPH-oxidase podem ser alvos promissores para farmacoterapias aplicadas ao TCE humano, embora mais estudos nessa área ainda sejam necessários. A figura 8 sumariza a conclusão do presente estudo.

REFERÊNCIAS

6.1. REFERÊNCIAS

AARABI, B.; SIMARD, J. M. Traumatic brain injury. **Curr Opin Crit Care**, v. 15, n. 6, p. 548-553, Dec 2009.

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006.

ABDEL BAKI, S. G. et al. 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.

ABDUL-MUNEER, P. M. et al. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in an animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast. **Free Radic Biol Med**, v. 60, p. 282-291, Jul 2013.

ABRAMOV, A. Y. et al. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. **J Neurosci**, v. 25, n. 40, p. 9176-9184, Oct 5 2005.

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 1, p. 125-169, Jan 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, Mar-Apr 2010.

AKITA, T.; OKADA, Y. Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca²⁺ nanodomains in mouse astrocytes. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 16, p. 3909-3927, Aug 15 2011.

ALBERT-WEISSENBERGER, C.; SIREN, A. L.; KLEINSCHNITZ, C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system. **Prog Neurobiol**, v. 101-102, p. 65-82, Feb-Mar 2013.

ALBERT-WEISSENBERGER, C. et al. Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 9, p. 1747-1756, Sep 2012.

AMARA, S. G.; FONTANA, A. C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int**, v. 41, n. 5, p. 313-318, Nov 2002.

- ANDRIESSEN, T. M.; JACOBS, B.; VOS, P. E. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 10, p. 2381-2392, Oct 2010.
- ARCINIEGAS, D. B. The cholinergic hypothesis of cognitive impairment caused by traumatic brain injury. **Curr Psychiatry Rep**, v. 5, n. 5, p. 391-399, Oct 2003.
- ARREOLA-RISA, C. et al. Trauma care systems in urban Latin America: the priorities should be prehospital and emergency room management. **J Trauma**, v. 39, n. 3, p. 457-462, Sep 1995.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 669-692, 2009.
- BADAUT, J. et al. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 5, p. 477-482, May 2001.
- BADAUT, J. et al. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, n. 4, p. 367-378, Apr 2002.
- BANKS, W. A. Blood-brain barrier as a regulatory interface. **Forum Nutr**, v. 63, p. 102-110, 2010.
- BARATZ, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor, 3,6'-dithiothalidomide, reverses behavioral impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. **J Neurochem**, v. 118, n. 6, p. 1032-1042, Sep 2011.
- BARGER, S. W. et al. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. **J Neurochem**, v. 101, n. 5, p. 1205-1213, Jun 2007.
- BARITAUD, M. et al. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 16, p. 3166-3173, Aug 15 2010.
- BARZO, P. et al. Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. **J Neurosurg**, v. 85, n. 6, p. 1113-1121, Dec 1996.
- BARZO, P. et al. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. **J Neurosurg**, v. 87, n. 6, p. 900-907, Dec 1997.
- BASTIAN, S. et al. Interleukin 8 (IL-8) induces the expression of kinin B1 receptor in human lung fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 253, n. 3, p. 750-755, Dec 30 1998.
- BASU, A. et al. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. **J Neurosci**, v. 22, n. 14, p. 6071-6082, Jul 15 2002.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007.

BERMPOHL, D. et al. TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 11, p. 1806-1818, Nov 2007.

BEY, E. A. et al. Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5730-5738, Nov 1 2004.

BIEGON, A. et al. Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 14, p. 5117-5122, Apr 6 2004.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 57-69, Jan 2007.

BLOOM, D.; DHAKSHINAMOORTHY, S.; JAISWAL, A. K. Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. **Oncogene**, v. 21, n. 14, p. 2191-2200, Mar 28 2002.

BOCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J Leukoc Biol**, v. 68, n. 5, p. 587-592, Nov 2000.

BODWELL, J. E.; HOLBROOK, N. J.; MUNCK, A. Sulfhydryl-modifying reagents reversibly inhibit binding of glucocorticoid-receptor complexes to DNA-cellulose. **Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1392-1398, Mar 27 1984.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 66-75, Feb 2001.

BRAMLETT, H. M.; DIETRICH, W. D. Quantitative structural changes in white and gray matter 1 year following traumatic brain injury in rats. **Acta Neuropathol**, v. 103, n. 6, p. 607-614, Jun 2002.

BRECHTER, A. B.; LERNER, U. H. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 3, p. 910-923, Mar 2007.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, Nov 1 2009.

BROWN, G. C.; NEHER, J. J. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. **Mol Neurobiol**, v. 41, n. 2-3, p. 242-247, Jun 2010.

- BUKI, A. et al. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 attenuates traumatically induced axonal injury. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 3, p. 261-268, Mar 2003.
- BUKI, A. et al. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. **J Neurosci**, v. 20, n. 8, p. 2825-2834, Apr 15 2000.
- BUKI, A.; POVLISHOCK, J. T. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 148, n. 2, p. 181-193; discussion 193-184, Feb 2006.
- BULLOCK, R. et al. Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 427-434, May 1991.
- BULLOCK, R. et al. Evidence for prolonged release of excitatory amino acids in severe human head trauma. Relationship to clinical events. **Ann N Y Acad Sci**, v. 765, p. 290-297; discussion 298, Sep 15 1995.
- BULLOCK, R. et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. **J Neurosurg**, v. 89, n. 4, p. 507-518, Oct 1998.
- CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, Jul 2000.
- CALIXTO, J. B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 7, p. 803-818, Dec 2004.
- CEDERBAUM, A. I.; DICKER, E.; COHEN, G. Role of hydroxyl radicals in the iron-ethylenediaminetetraacetic acid mediated stimulation of microsomal oxidation of ethanol. **Biochemistry**, v. 19, n. 16, p. 3698-3704, Aug 5 1980.
- CEDERBERG, D.; SIESJO, P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? **Childs Nerv Syst**, v. 26, n. 2, p. 221-226, Feb 2010.
- CHEN, B. C. et al. Bradykinin B2 receptor mediates NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via the Ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. **J Immunol**, v. 173, n. 8, p. 5219-5228, Oct 15 2004.
- CHEN, H. et al. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 3, p. 341-348, Jun 2011.
- CHENG, G. et al. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 4, p. 699-719, Oct 2012.
- CHERIAN, L.; HLATKY, R.; ROBERTSON, C. S. Nitric oxide in traumatic brain injury. **Brain Pathol**, v. 14, n. 2, p. 195-201, Apr 2004.

CHERIAN, L. et al. Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 5, p. 573-585, Oct 1994.

CHIANG, W. C. et al. Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 8, p. 1304-1314, Oct 15 2006.

CHIARUGI, P.; CIRRI, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 9, p. 509-514, Sep 2003.

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, Dec 2011.

CHOI, B. Y. et al. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. **Brain Res**, v. 1481, p. 49-58, Oct 24 2012.

CHOI, S. H. et al. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. **J Neurochem**, v. 120, n. 2, p. 292-301, Jan 2012.

CHOLEWINSKI, A. J. et al. Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. **J Neurochem**, v. 57, n. 4, p. 1456-1458, Oct 1991.

CICERONE, K. D. et al. Evidence-based cognitive rehabilitation: recommendations for clinical practice. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 81, n. 12, p. 1596-1615, Dec 2000.

CLAUSEN, F. et al. Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. **Eur J Neurosci**, v. 30, n. 3, p. 385-396, Aug 2009.

CLAUSEN, F. et al. Neutralization of interleukin-1beta reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. **Eur J Neurosci**, v. 34, n. 1, p. 110-123, Jul 2011.

CLAUSEN, F. et al. Correlation of hippocampal morphological changes and morris water maze performance after cortical contusion injury in rats. **Neurosurgery**, v. 57, n. 1, p. 154-163; discussion 154-163, Jul 2005.

CORONADO, V. G. et al. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. **MMWR Surveill Summ**, v. 60, n. 5, p. 1-32, May 6 2011.

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1-3, p. 161-176, Oct 19 2001.

COYOY, A. et al. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 8, p. 1056-1064, Oct 15 2008.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-758, Jun 2005.

DE WEERD, W. F.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 28, p. 17858-17866, Jul 11 1997.

DECUYPERE, M.; KLIMO, P., JR. Spectrum of traumatic brain injury from mild to severe. **Surg Clin North Am**, v. 92, n. 4, p. 939-957, ix, Aug 2012.

DEWAS, C. et al. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 5238-5244, Nov 1 2000.

DICKEY, C. A. et al. Dysregulation of Na⁺/K⁺ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. **BMC Neurosci**, v. 6, p. 7, 2005.

DOHI, K. et al. Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 41, 2010.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 180-190, Nov 2001.

DONKIN, J. J.; VINK, R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 3, p. 293-299, Jun 2010.

EL BENNA, J. et al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 11, p. 6374-6378, Mar 15 1996.

ELLIS, E. F.; CHAO, J.; HEIZER, M. L. Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. **J Neurosurg**, v. 71, n. 3, p. 437-442, Sep 1989.

ERDOS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v. 16, n. 4, p. 363-370, Oct 1990.

FARKAS, O.; POVLISHOCK, J. T. Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. **Prog Brain Res**, v. 161, p. 43-59, 2007.

FAUL, M. et al. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002 – 2006., SERVICES, U. S. D. O. H. A. H., Centers for Disease Control and Preventio. Atlanta (GA). 2010. Disponível em: < http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/tbi_ed.html >.

FERNANDES, R. N. R. **Análise Epidemiológica das hospitalizações no Sistema Único de Saúde, por traumatismo crânio encefálico. Brasil: 2001-2007.** 2010. (Mestrado). Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia.

FERREIRA, A. A. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Rev Assoc Med** v. 55, p. 75-81, 2009.

FOX, G. B. et al. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 8, p. 599-614, Aug 1998.

FRANCEL, P. C. Bradykinin and neuronal injury. **J Neurotrauma**, v. 9 Suppl 1, p. S27-45, Mar 1992.

FUJIMOTO, S. T. et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-378, Jul 2004.

GAETZ, M. The neurophysiology of brain injury. **Clin Neurophysiol**, v. 115, n. 1, p. 4-18, Jan 2004.

GAHM, C. et al. Neuroprotection by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experimental brain contusion. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 9, p. 1343-1354, Sep 2006.

GAO, H. M.; ZHOU, H.; HONG, J. S. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 6, p. 295-303, Jun 2012.

GEISZT, M. et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. **FASEB J**, v. 17, n. 11, p. 1502-1504, Aug 2003.

GENNARELLI, T. A. Mechanisms of brain injury. **J Emerg Med**, v. 11 Suppl 1, p. 5-11, 1993.

GENNARELLI, T. A.; GRAHAM, D. I. Neuropathology. In: SILVER, J. M. (Ed.). **Textbook of traumatic brain injury**. Washington DC: American Psychiatric Publishing, Inc, v.1, 2005. p.27-50.

GHOSH, A. et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 241, 2012.

GIULIAN, D. et al. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **J Neurosci**, v. 9, n. 12, p. 4416-4429, Dec 1989.

GLOBUS, M. Y. et al. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. **J Neurochem**, v. 65, n. 4, p. 1704-1711, Oct 1995.

GORLACH, C. et al. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 8, p. 833-838, Aug 2001.

GOSS, J. R. et al. Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. **Exp Neurol**, v. 149, n. 2, p. 301-309, Feb 1998.

GRAHAM, D. I.; GENNARELLI, T. A.; MCINTOSH, T. K. Trauma. In: GRAHAM, D. I. e LANTOS, P. L. (Ed.). **Greenfield's Neuropathology**. London, 2002. p.823-844.

GREENE, E. L.; VELARDE, V.; JAFFA, A. A. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 942-947, Apr 2000.

GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N.; LEFER, D. J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 4-5, p. 404-433, Sep 1998.

GROGER, M. et al. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 25, n. 8, p. 978-989, Aug 2005.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-487, Dec 2003.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cell Signal**, v. 14, n. 11, p. 879-897, Nov 2002.

HADDAD, J. J.; LAND, S. C. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 2, p. 520-536, Jan 2002.

HALL, E. D.; WANG, J. A.; MILLER, D. M. Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 238, n. 2, p. 176-182, Dec 2012.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, Nov 1 1998.

HAN, C. H.; LEE, M. H. Activation domain in P67phox regulates the steady state reduction of FAD in gp91phox. **J Vet Sci**, v. 1, n. 1, p. 27-31, Jun 2000.

HAN, R. Z. et al. NMDA receptor antagonist MK-801 reduces neuronal damage and preserves learning and memory in a rat model of traumatic brain injury. **Neurosci Bull**, v. 25, n. 6, p. 367-375, Dec 2009.

HARRIGAN, T. J. et al. Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. **J Neurochem**, v. 106, n. 6, p. 2449-2462, Sep 2008.

HAYWARD, N. M. et al. Magnetic resonance imaging of regional hemodynamic and cerebrovascular recovery after lateral fluid-percussion brain injury in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 1, p. 166-177, Jan 2011.

HE, P.; ZENG, M.; CURRY, F. E. Dominant role of cAMP in regulation of microvessel permeability. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 278, n. 4, p. H1124-1133, Apr 2000.

HE, P.; ZHANG, X.; CURRY, F. E. Ca²⁺ entry through conductive pathway modulates receptor-mediated increase in microvessel permeability. **Am J Physiol**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. H2377-2387, Dec 1996.

HECQUET, C. et al. Kallikreins when activating bradykinin B2 receptor induce its redistribution on plasma membrane. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 13-14, p. 1795-1806, Dec 2002.

HECQUET, C. et al. Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. **Mol Pharmacol**, v. 58, n. 4, p. 828-836, Oct 2000.

HELLAL, F. et al. Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 9, p. 841-851, Sep 2003.

HELMY, A. et al. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. **Prog Neurobiol**, v. 95, n. 3, p. 352-372, Nov 2011.

HEYWORTH, P. G. et al. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. **J Clin Invest**, v. 87, n. 1, p. 352-356, Jan 1991.

HICKS, R. et al. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. **Acta Neuropathol**, v. 91, n. 3, p. 236-246, 1996.

HICKS, R. R. et al. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. **J Neurotrauma**, v. 10, n. 4, p. 405-414, Winter 1993.

HIERHOLZER, C. et al. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. **J Exp Med**, v. 187, n. 6, p. 917-928, Mar 16 1998.

HIERHOLZER, C. et al. A nitric oxide scavenger protects against pulmonary inflammation following hemorrhagic shock. **Shock**, v. 17, n. 2, p. 98-103, Feb 2002.

HSIEH, H. L. et al. BK-induced COX-2 expression via PKC-delta-dependent activation of p42/p44 MAPK and NF-kappaB in astrocytes. **Cell Signal**, v. 19, n. 2, p. 330-340, Feb 2007.

HSIEH, H. L. et al. Reactive Oxygen Species-Dependent c-Fos/Activator Protein 1 Induction Upregulates Heme Oxygenase-1 Expression by Bradykinin in Brain Astrocytes. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 12, p. 1829-1844, Dec 15 2010.

HSIEH, H. L. et al. Intracellular signalings underlying bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocyte-1. **Cell Signal**, v. 16, n. 10, p. 1163-1176, Oct 2004.

HSU, H. Y.; WEN, M. H. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22131-22139, Jun 21 2002.

IMPELLIZZERI, D. et al. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 5, p. 636-648, Mar 1 2011.

INFANGER, D. W.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1583-1596, Sep-Oct 2006.

IVASHKOVA, Y. et al. 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, Oct 2006.

JACKMAN, K. A. et al. Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox2-deficient mice. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 4, p. 680-688, Feb 2009.

JAFARIAN-TEHRANI, M. et al. 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. **Nitric Oxide**, v. 12, n. 2, p. 61-69, Mar 2005.

JAQUET, V. et al. Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 10, p. 2535-2552, Oct 2009.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **J Biol Chem**, v. 268, n. 13, p. 9496-9503, May 5 1993.

JEFTINIJA, S. D. et al. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. **J Neurochem**, v. 66, n. 2, p. 676-684, Feb 1996.

JINNOUCHI, Y. et al. Administration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits cold injury-induced brain edema in mice. **Brain Res**, v. 1167, p. 92-100, Sep 5 2007.

JOHNSON, D. K. et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.

JOHNSON, J. L. et al. Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. **J Biol Chem**, v. 273, n. 52, p. 35147-35152, Dec 25 1998.

JOHNSON, V. E.; STEWART, W.; SMITH, D. H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 246, p. 35-43, Aug 2013.

JONES, N. C. et al. A detrimental role for nitric oxide synthase-2 in the pathology resulting from acute cerebral injury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 63, n. 7, p. 708-720, Jul 2004.

JONES, N. C. et al. Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 72-78, Jul 2005.

JUNQUE, C. [Neuropsychological sequelae of head injury]. **Rev Neurol**, v. 28, n. 4, p. 423-429, Feb 16-28 1999.

KAHLES, T.; BRANDES, R. P. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 14, p. 2345-2363, Jul 2012.

_____. Which NADPH oxidase isoform is relevant for ischemic stroke? The case for nox 2. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 12, p. 1400-1417, Apr 20 2013.

KAMADA, M. et al. Observation of tissue prokallikrein activation by some serine proteases, arginine esterases in rat submandibular gland. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 166, n. 1, p. 231-237, Jan 15 1990.

KAPLAN, A. P. et al. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. **Adv Immunol**, v. 66, p. 225-272, 1997.

KAPLANSKI, J. et al. LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. **Resuscitation**, v. 56, n. 2, p. 207-213, Feb 2003.

KASTRITSIS, C. H.; MCCARTHY, K. D. Oligodendroglial lineage cells express neuroligand receptors. **Glia**, v. 8, n. 2, p. 106-113, Jun 1993.

KATAYAMA, Y.; KAWAMATA, T. Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. **Acta Neurochir Suppl**, v. 86, p. 323-327, 2003.

KAWAMATA, T. et al. Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. **Brain Res**, v. 674, n. 2, p. 196-204, Mar 20 1995.

KEMPSKI, O. Cerebral edema. **Semin Nephrol**, v. 21, n. 3, p. 303-307, May 2001.

KHUMAN, J. et al. Tumor necrosis factor alpha and Fas receptor contribute to cognitive deficits independent of cell death after concussive traumatic brain injury in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 2, p. 778-789, Feb 2011.

KIM, Y. M. et al. Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). **J Immunol**, v. 161, n. 8, p. 4122-4128, Oct 15 1998.

KISHIDA, K. T.; KLANN, E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 2, p. 233-244, Feb 2007.

KITAGAWA, A. et al. Localization of kallikrein in rat pineal glands. **Endocrinol Jpn**, v. 38, n. 1, p. 109-112, Feb 1991.

KLASNER, B. et al. Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. **Neurochem Int**, v. 49, n. 5, p. 442-447, Oct 2006.

KNOBLACH, S. M.; FADEN, A. I. Cortical interleukin-1 beta elevation after traumatic brain injury in the rat: no effect of two selective antagonists on motor recovery. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 1, p. 5-8, Jul 28 2000.

KNOBLACH, S. M.; FAN, L.; FADEN, A. I. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. **J Neuroimmunol**, v. 95, n. 1-2, p. 115-125, Mar 1 1999.

KNOBLACH, S. M. et al. Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome. **J Neurotrauma**, v. 19, n. 10, p. 1155-1170, Oct 2002.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, Nov 2003.

KOLTE, D. et al. High molecular weight kininogen activates B2 receptor signaling pathway in human vascular endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 28, p. 24561-24571, Jul 15 2011.

KOMJATI, K.; BESSON, V. C.; SZABO, C. Poly (adp-ribose) polymerase inhibitors as potential therapeutic agents in stroke and neurotrauma. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 4, n. 2, p. 179-194, Apr 2005.

KRAUS, J. F.; CHU, L. D. Epidemiology. In: SILVER, J. M.; MCALLISTER, T. W., *et al* (Ed.). **Textbook of traumatic brain injury**. Washington, DC

London, England: American Psychiatric Publishing, 2005.

KRISTAL, B. S.; DUBINSKY, J. M. Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling-dependent and -independent pathways. **J Neurochem**, v. 69, n. 2, p. 524-538, Aug 1997.

KUHN, D. M. *et al*. Nitrotyrosine as a marker for peroxynitrite-induced neurotoxicity: the beginning or the end of the end of dopamine neurons? **J Neurochem**, v. 89, n. 3, p. 529-536, May 2004.

KUNZ, M. *et al*. Bradykinin in Blood and Cerebrospinal Fluid after Acute Cerebral Lesions: Correlations with Cerebral Edema and Intracranial Pressure. **J Neurotrauma**, v. 30, n. 19, p. 1638-1644, Oct 1 2013.

LAL, M. A. *et al*. Bradykinin-stimulated cPLA2 phosphorylation is protein kinase C dependent in rabbit CCD cells. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. F907-915, Dec 1997.

LAM, G. Y.; HUANG, J.; BRUMELL, J. H. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. **Semin Immunopathol**, v. 32, n. 4, p. 415-430, Dec 2010.

LARSEN, B. T. *et al*. Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 5, p. 739-745, May 2009.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch**, v. 460, n. 2, p. 525-542, Jul 2010.

LAWRENCE, C. B.; ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 10, n. 3, p. 1188-1195, Mar 1998.

LEE, C. H. *et al*. Bradykinin-induced IL-6 expression through bradykinin B2 receptor, phospholipase C, protein kinase Cdelta and NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. **Mol Immunol**, v. 45, n. 14, p. 3693-3702, Aug 2008.

LEE, C. W. *et al*. Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by TNF-alpha mediated through Nox2, MAPKs, NF-kappaB, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 8, p. 2103-2114, Aug 2011.

- LEEB-LUNDBERG, L. M. et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 1, p. 27-77, Mar 2005.
- LEUSEN, J. H. et al. A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. **J Clin Invest**, v. 93, n. 5, p. 2120-2126, May 1994.
- LEVY, A. et al. CD38 facilitates recovery from traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 9, p. 1521-1533, Sep 2009.
- LI, J. et al. Oligomeric A β -induced microglial activation is possibly mediated by NADPH oxidase. **Neurochem Res**, v. 38, n. 2, p. 443-452, Feb 2013.
- LI, M. et al. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. **Mol Med Rep**, v. 7, n. 1, p. 47-52, Jan 2013.
- LIANG, D. et al. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. **Neurosurg Focus**, v. 22, n. 5, p. E2, 2007.
- LIMA, F. D. et al. Na⁺,K⁺-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, Nov 21 2008.
- LIN, C. C. et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signal contributes to bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes. **Cell Commun Signal**, v. 10, n. 1, p. 35, 2012.
- LIN, Y.; PIXLEY, R. A.; COLMAN, R. W. Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high-molecular weight kininogen (HK) with heparin. **Biochemistry**, v. 39, n. 17, p. 5104-5110, May 2 2000.
- LIU, H. T. et al. Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 10, p. 2197-2209, May 15 2009.
- LIU, Y. et al. Molecular imaging of inflammation and platelet adhesion in advanced atherosclerosis effects of antioxidant therapy with NADPH oxidase inhibition. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 6, n. 1, p. 74-82, Jan 1 2013.
- LIU, Y. R. et al. Progressive metabolic and structural cerebral perturbations after traumatic brain injury: an in vivo imaging study in the rat. **J Nucl Med**, v. 51, n. 11, p. 1788-1795, Nov 2010.
- LO, W. et al. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcomes in surgically-induced brain injury. **Neurosci Lett**, v. 414, n. 3, p. 228-232, Mar 13 2007.

LOANE, D. J.; BYRNES, K. R. Role of microglia in neurotrauma. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 366-377, Oct 2010.

LONGHI, L. et al. Effect of traumatic brain injury on cognitive function in mice lacking p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. **Acta Neurochir Suppl**, v. 102, p. 409-413, 2008.

LORENZO, H. K.; SUSIN, S. A. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. **Drug Resist Updat**, v. 10, n. 6, p. 235-255, Dec 2007.

LOUIN, G. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 2, p. 182-190, Feb 2006.

LU, J. et al. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 3795-3813, 2009.

LU, J. et al. Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 2, p. 253-263, Feb 2003.

MANDER, P. K.; JEKABSONE, A.; BROWN, G. C. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. **J Immunol**, v. 176, n. 2, p. 1046-1052, Jan 15 2006.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 357-386, Sep 1998.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 10, p. 845-852, Oct 2004.

MARIN-TEVA, J. L. et al. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. **Neuron**, v. 41, n. 4, p. 535-547, Feb 19 2004.

MARKLUND, N. et al. Free radical scavenger posttreatment improves functional and morphological outcome after fluid percussion injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 8, p. 821-832, Aug 2001.

MARMAROU, A. et al. A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 22, n. 12, p. 1444-1455, Dec 2005.

MARMAROU, C. R. et al. Quantitative analysis of the relationship between intra-axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 22, n. 10, p. 1066-1080, Oct 2005.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J**, v. 14, n. 13, p. 1889-1900, Oct 2000.

MAUTES, A. E.; FUKUDA, K.; NOBLE, L. J. Cellular response in the cerebellum after midline traumatic brain injury in the rat. **Neurosci Lett**, v. 214, n. 2-3, p. 95-98, Aug 23 1996.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, Nov 25 1969.

MCGINN, M. J. et al. Biochemical, structural, and biomarker evidence for calpain-mediated cytoskeletal change after diffuse brain injury uncomplicated by contusion. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 68, n. 3, p. 241-249, Mar 2009.

MCINTOSH, T. K. et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. **Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 233-244, 1989.

MELO, J. R. T.; SILVA, R. A. S.; MOREIRA, E. D. Características dos pacientes com trauma cranioencefálico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 3-A, p. 711-715, 2004.

MORALES, D. M. et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? **Neuroscience**, v. 136, n. 4, p. 971-989, 2005.

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci**, v. 99, n. 1, p. 6-38, Sep 2005.

MOREHOUSE, K. M.; MASON, R. P. The transition metal-mediated formation of the hydroxyl free radical during the reduction of molecular oxygen by ferredoxin-ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. **J Biol Chem**, v. 263, n. 3, p. 1204-1211, Jan 25 1988.

MOTTA, G. et al. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. **Blood**, v. 91, n. 2, p. 516-528, Jan 15 1998.

MOURA, J. C. et al. Perfil clínico-epidemiológico de traumatismo cranioencefálico do Hospital de Urgências e Traumas no município de Petrolina, estado de Pernambuco. **Arq Bras Neurocir**, v. 30, n. 3, p. 99-104, 2011.

MULLER, F. J.; SNYDER, E. Y.; LORING, J. F. Gene therapy: can neural stem cells deliver? **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 75-84, Jan 2006.

MYER, D. J. et al. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 10, p. 2761-2772, Oct 2006.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, May 27 2005.

NISIMOTO, Y. et al. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). **J Biol Chem**, v. 274, n. 33, p. 22999-23005, Aug 13 1999.

NODA, M. et al. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life Sci**, v. 72, n. 14, p. 1573-1581, Feb 21 2003.

NODA, Y.; TAKADA, Y.; ERDOS, E. G. Activation of human and rabbit prokallikrein by serine and metalloproteases. **Kidney Int**, v. 27, n. 4, p. 630-635, Apr 1985.

O'CONNOR, C. A.; CERNAK, I.; VINK, R. The temporal profile of edema formation differs between male and female rats following diffuse traumatic brain injury. **Acta Neurochir Suppl**, v. 96, p. 121-124, 2006.

PAN, Z. K. et al. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells. **J Immunol**, v. 160, n. 6, p. 3038-3045, Mar 15 1998.

PARPURA, V. et al. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-747, Jun 30 1994.

PARPURA, V. et al. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. **J Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 5831-5839, Aug 1995.

PATERGNANI, S. et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 19, 2011.

PESQUERO, J. B. et al. Transcriptional regulatory elements in the rat bradykinin B2 receptor gene. **Immunopharmacology**, v. 33, n. 1-3, p. 36-41, Jun 1996.

PETRONIO, M. S. et al. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2821-2839, 2013.

PETTUS, E. H. et al. Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 5, p. 507-522, Oct 1994.

PHAGOO, S. B.; POOLE, S.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 2, p. 325-333, Aug 1999.

PHAGOO, S. B. et al. Regulation of bradykinin receptor gene expression in human lung fibroblasts. **Eur J Pharmacol**, v. 397, n. 2-3, p. 237-246, Jun 2 2000.

PLESNILA, N. et al. Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 10, p. 1049-1058, Oct 2001.

QIN, L. et al. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. **Glia**, v. 61, n. 6, p. 855-868, Jun 2013.

QIN, L. et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. **J Biol Chem**, v. 279, n. 2, p. 1415-1421, Jan 9 2004.

QUINTANA, A. et al. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. **J Neurosci Res**, v. 82, n. 5, p. 701-716, Dec 1 2005.

RADA, B.; LETO, T. L. Characterization of hydrogen peroxide production by Duox in bronchial epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Lett**, v. 584, n. 5, p. 917-922, Mar 5 2010.

RADI, R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, n. 2, p. 481-487, Aug 1 1991.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **Eur Respir J**, v. 28, n. 1, p. 219-242, Jul 2006.

RAIDOO, D. M.; BHOOLA, K. D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. **Pharmacol Ther**, v. 79, n. 2, p. 105-127, Aug 1998.

RAIDOO, D. M. et al. Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. **Immunopharmacology**, v. 33, n. 1-3, p. 104-107, Jun 1996.

RASLAN, F. et al. Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood-brain barrier leakage and inflammation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 8, p. 1477-1486, Aug 2010.

RAZ, L. et al. Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12606, 2010.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, v. 32, n. 1, p. 1-46, Mar 1980.

REINEHR, R. et al. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. **Glia**, v. 55, n. 7, p. 758-771, May 2007.

RENEER, D. V. et al. A multi-mode shock tube for investigation of blast-induced traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 28, n. 1, p. 95-104, Jan 2011.

RIGGIO, S. Traumatic brain injury and its neurobehavioral sequelae. **Psychiatr Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 807-819, Dec 2010.

ROSENFELD, J. V. et al. Early management of severe traumatic brain injury. **Lancet**, v. 380, n. 9847, p. 1088-1098, Sep 22 2012.

RUDGE, J. S. Astrocyte-derived neurotrophic factors. In: MURPHY, S. (Ed.). **Astrocyte-derived neurotrophic factors**. San Diego: Academic Press, Inc, 1993. p.267-305

RUY, E. L.; ROSA, M. I. Perfil epidemiológico de pacientes com traumatismo crânio encefálico. **Arquivos Catarinenses de Medicina** v. 40, n. 3, p. 17-20, 2011.

RYAN, K. A. et al. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2123-2130, Apr 2004.

SAATMAN, K. E.; CREED, J.; RAGHUPATHI, R. Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 31-42, Jan 2010.

SAATMAN, K. E. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 719-738, Jul 2008.

SABATINI, F. et al. Bradykinin-induced asthmatic fibroblast/myofibroblast activities via bradykinin B2 receptor and different MAPK pathways. **Eur J Pharmacol**, v. 710, n. 1-3, p. 100-109, Jun 15 2013.

SANDERSON, K. L. et al. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates regional neuronal cell death and cognitive dysfunction after experimental brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 10, p. 1118-1125, Oct 1999.

SCHERBEL, U. et al. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8721-8726, Jul 20 1999.

SCHMIDLIN, F. et al. Interleukin-1beta induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v. 53, n. 6, p. 1009-1015, Jun 1998.

SCHOCH, K. M. et al. Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 236, n. 2, p. 371-382, Aug 2012.

SCHWANINGER, M. et al. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. **J Neurochem**, v. 73, n. 4, p. 1461-1466, Oct 1999.

SCHWARZBACH, E. et al. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. **Hippocampus**, v. 16, n. 6, p. 541-550, 2006.

SCORRANO, L.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. **J Biol Chem**, v. 272, n. 19, p. 12295-12299, May 9 1997.

SERNA, E. C.; SOUSA, R. M. C. Depressão: uma possível consequência adversa do trauma crânio-encefálico para o cuidador familiar. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 131-135, 2005.

SHEN, J. et al. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 12, p. 1780-1786, Jun 15 2011.

SHOHAMI, E. et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 16, n. 3, p. 378-384, May 1996.

SHOHAMI, E. et al. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 169-177, Feb 1997.

SINGLETON, R. H. et al. 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, Jun 2010.

SINGLETON, R. H. et al. Traumatically induced axotomy adjacent to the soma does not result in acute neuronal death. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 791-802, Feb 1 2002.

SINZ, E. H. et al. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. **J Clin Invest**, v. 104, n. 5, p. 647-656, Sep 1999.

SKANDSEN, T. et al. Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. **J Neurosurg**, v. 113, n. 3, p. 556-563, Sep 2010.

SKIDGEL, R. A. Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. **Trends Pharmacol Sci**, v. 9, n. 8, p. 299-304, Aug 1988.

SONG, S. X. et al. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. **Mol Med Rep**, Oct 24 2012.

STOLK, J. et al. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 11, n. 1, p. 95-102, Jul 1994.

STONE, J. R. et al. Impaired axonal transport and altered axolemmal permeability occur in distinct populations of damaged axons following traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 1, p. 59-69, Nov 2004.

STONE, J. R.; SINGLETON, R. H.; POVLISHOCK, J. T. Intra-axonal neurofilament compaction does not evoke local axonal swelling in all traumatically injured axons. **Exp Neurol**, v. 172, n. 2, p. 320-331, Dec 2001.

STOVER, J. F.; DOHSE, N. K.; UNTERBERG, A. W. Bradykinin 2 receptor antagonist LF 16-0687Ms reduces posttraumatic brain edema. **Acta Neurochir Suppl**, v. 76, p. 171-175, 2000.

SU, J. et al. Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 388, n. 2, p. 205-211, Oct 16 2009.

SUGIMOTO, K. et al. Evidence for a role of kallikrein-P6nin system in patients with shock after blunt trauma. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 2, p. R1556-1560, Jun 1998.

SULLIVAN, P. G. et al. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 949, n. 1-2, p. 88-96, Sep 13 2002.

SUNDAR, I. K. et al. Oxidative stress, thiol redox signaling methods in epigenetics. **Methods Enzymol**, v. 474, p. 213-244, 2010.

SURACE, M. J.; BLOCK, M. L. Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 14, p. 2409-2427, Jul 2012.

TANG, X. N. et al. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 556-562, Jun 23 2008.

TEHRANIAN, R. et al. 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, Aug 2002.

THOMPSON, H. J. et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. **J Neurotrauma**, v. 22, n. 1, p. 42-75, Jan 2005.

THOMPSON, J.; SEBASTIANELLI, W.; SLOBOUNOV, S. EEG and postural correlates of mild traumatic brain injury in athletes. **Neurosci Lett**, v. 377, n. 3, p. 158-163, Apr 4 2005.

THORNTON, E. et al. Kinin receptor antagonists as potential neuroprotective agents in central nervous system injury. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6598-6618, Sep 2010.

TRABOLD, R. et al. The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 1, p. 130-139, Jan 2010.

UMPHRED, D. A. **Traumatismos Cranianos**. 2. São Paulo: Manole, 1994. ISBN 8520400485.

UNTERBERG, A. W. et al. Edema and brain trauma. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 1021-1029, 2004.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human physiology the mechanisms of body function**. Boston: McGraw-Hill, 2001.

VECIL, G. G. et al. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. **J Neurosci Res**, v. 61, n. 2, p. 212-224, Jul 15 2000.

VELARDE, V. et al. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. **Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 419-430, 2004.

WADA, K. et al. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. **J Neurosurg**, v. 89, n. 5, p. 807-818, Nov 1998.

_____. Effects of L-NAME and 7-NI on NOS catalytic activity and behavioral outcome after traumatic brain injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 16, n. 3, p. 203-212, Mar 1999.

WADA, K. et al. Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. **Neurosurgery**, v. 43, n. 6, p. 1427-1436, Dec 1998.

WAHL, M. et al. Effects of bradykinin in the cerebral circulation. **Acta Physiol Hung**, v. 86, n. 2, p. 155-160, 1999.

WAHL, M. et al. Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, v. 57, p. 64-72, 1993.

WAHL, M. et al. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. **Immunopharmacology**, v. 33, n. 1-3, p. 257-263, Jun 1996.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int**, v. 26, n. 1, p. 1-16; discussion 17-26, Jan 1995.

WANG, G. et al. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. **J Neurosci**, v. 24, n. 24, p. 5516-5524, Jun 16 2004.

WANG, T. et al. Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. **J Neurochem**, v. 88, n. 4, p. 939-947, Feb 2004.

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

WHO. 10 FACTS ON INJURIES AND VIOLENCE. 2009. Disponível em: < <http://www.who.int/features/factfiles/injuries/facts/en/index.html> >. Acesso em: 01 fev 2009.

WOODFIN, A. et al. Acute NADPH oxidase activation potentiates cerebrovascular permeability response to bradykinin in ischemia-reperfusion. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 4, p. 518-524, Feb 15 2011.

WU, F.; TYML, K.; WILSON, J. X. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. **J Cell Physiol**, v. 217, n. 1, p. 207-214, Oct 2008.

XING, M.; TAO, L.; INSEL, P. A. Role of extracellular signal-regulated kinase and PKC alpha in cytosolic PLA2 activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. **Am J Physiol**, v. 272, n. 4 Pt 1, p. C1380-1387, Apr 1997.

XIONG, Y. et al. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 1, p. 23-34, Jan 1997.

XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Animal models of traumatic brain injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 128-142, Feb 2013.

YAMASHIMA, T. et al. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. **Hippocampus**, v. 13, n. 7, p. 791-800, 2003.

YANG, C. M. et al. Multiple factors from bradykinin-challenged astrocytes contribute to the neuronal apoptosis: involvement of astroglial ROS, MMP-9, and HO-1/CO system. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 3, p. 1020-1033, Jun 2013.

YANG, C. S. et al. Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. **J Neuroinflammation**, v. 4, p. 27, 2007.

YOSHIHARA, A. et al. Regulation of dual oxidase expression and H2O2 production by thyroglobulin. **Thyroid**, v. 22, n. 10, p. 1054-1062, Oct 2012.

YOU, Z. et al. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, n. 9, p. 1564-1573, Sep 2008.

ZHANG, Q. G. et al. Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34504, 2012.

ZHANG, Z. et al. Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 15839-15844, May 26 2000.

ZHAO, Y. et al. Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 4, p. H1821-1829, Apr 2001.

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

ZWECKBERGER, K.; PLESNILA, N. Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury. **Neurosci Lett**, v. 454, n. 2, p. 115-117, Apr 24 2009.