



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

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA NÃO PROTEGE DA
SUSCETIBILIDADE A CONVULSÕES APÓS TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

André Luis Lopes Saraiva

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA NÃO PROTEGE DA
SUSCETIBILIDADE A CONVULSÕES APÓS TRAUMATISMO
CRÂNIOENCEFÁLICO EM RATOS.**

Por

André Luis Lopes Saraiva

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA COM CREATINA
SOBRE O DANO OXIDATIVO E SUSCETIBILIDADE À
CONVULSÕES APÓS TRAUMATISMO CRÂNIO-ENCEFÁLICO
GRAVE EM RATOS.**

Elaborada por

André Luis Lopes Saraiva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA



Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (Orientador)



Mauro Schneider Oliveira (UNIPAMPA)



Maribel Antonello Rubin (UFSM)

Santa Maria, 6 de abril de 2011.

“Não basta conquistar a sabedoria,

é preciso usá-la”

(Cícero)

AGRADECIMENTOS

”Nossa vida é como um trem que anda em linha reta e durante sua viagem para em diversas estações. Em cada uma destas estações algumas pessoas descem, outras sobem e nos acompanham por mais algum tempo”. Durante o período de realização deste trabalho, muitas pessoas subiram nos vagões de meu trem e à cada uma, devo um agradecimento especial. Primeiro, agradeço à Naide (para quem não sabe, esta pessoa é minha mãe, mas como de costume sempre a chamo pelo nome e, não sei por qual motivo, as pessoas estranham este fato) por ser “os trilhos” de meu trem, sempre me guiando para melhor caminho e dando maior apoio em cada decisão que escolho tomar (acho que ela nunca vai descer do meu trem). Depois, agradeço ao Nando Royes, por ter me guiado durante a realização deste trabalho. Um especial agradecimento devo ao professor Carlos Mello que por muito tempo fez parte de minha formação científica e, por motivos alheios a nossa vontade, nossos trens tomaram rumos um pouco diferentes, mas o conhecimento fornecido e principalmente a amizade continuam. Também devo agradecer ao grupo que por muito tempo fiz: o grupo das “gurias da pirexia”. À estas gurias Juliana, Viviane e especialmente à Aninha, que não contente em me chamar de gurua, me acompanhou e ajudou durante a realização deste trabalho: também a vocês muito obrigado.

Durante esta longa passagem pelo LAB NEURO fiz grandes amizades, que não espero deixar para trás e não quero jamais esquecer. Falo da grande amizade e parceria que tenho pelo Leonardo (Leo), Leandro (Samurai), Luiz (Xará), Iago (ops Iuri), Frederico (Fred) e Maurício. Sempre prontos para um agito, conviver com esta gurizada só fez aumentar nossa amizade. Também devo um pedido de desculpas, por agüentarem meus dias de mau humor. Não posso esquecer a Mauren, que me deu o apelido de “porcaria” (ela deve gostar muito de mim). Agradeço também ao Fabrício que também fez parte deste trabalho e à todo o pessoal do laboratório de prédio 18 que por algum tempo também agüentaram minha presença.

Um agradecimento muito especial devo a Cássia, a Fê, a Fran e ao Vinni, que foram meus colegas durante minha graduação e ainda me acompanham na pós-graduação. Espero que nunca desçam de meu trem.

Agora parece que meu trem tomará outro rumo, pessoas novas subirão nos vagões. Porém, espero que todas estas pessoas que fizeram parte de minha vida durante algum tempo, continuem em algum vagão ou, fica o desejo de poder reencontrar cada uma delas em uma próxima estação. À todos muito OBRIGADO.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA NÃO PROTEGE DA SUSCETIBILIDADE À CONVULSÕES APÓS TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO EM RATOS.

Autor: André Luis Lopes Saraiva

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Local e data de defesa: Santa Maria, 6 de abril de 2011.

Estudos realizados ao longo dos últimos anos têm destacado o importante papel da creatina na saúde bem como no tratamento de diversas doenças neurológicas. Entretanto, seu papel no dano secundário induzido por traumatismo cranioencefálico (TCE) não está totalmente compreendido. O objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito da suplementação com creatina sobre o dano oxidativo e suscetibilidade a convulsões após TCE. Para isto, utilizamos o modelo de lesão por percussão de fluido (LPF) em ratos, onde a lesão encefálica é provocada por uma coluna líquida que exerce uma pressão sobre a duramáter intacta dos animais, a qual foi previamente exposta. Nossos resultados revelaram que em 4 e 8 dias após TCE, houve o aumento do dano oxidativo caracterizado pelo aumento de carbonilação protéica e dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e, também, houve uma redução da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase. A análise estatística (ANOVA de duas vias) também revelou que a suplementação com creatina (300 mg/kg, via oral), iniciando 30 minutos após o TCE e prolongando-se até o 3º, ou 7º dia após a lesão, reduziu a carbonilação protéica e os níveis de TBARS, quando analisado no 4º e 8º dia após a injúria. Entretanto a suplementação com creatina não protegeu da inibição da enzima Na^+ , K^+ -ATPase 4 e 8 dias após a TCE. Além disso, a análise eletroencefalográfica (EEG) revelou que a injeção de uma dose subconvulsivante (35 mg/Kg, intraperitoneal) de pentilenotetrazol (PTZ), em 4, mas não em 8 dias após TCE, diminuiu a latência para as convulsões tônico-clônicas generalizadas e aumentou o tempo de sua duração, quando comparado ao grupo controle. A suplementação de creatina não exerceu qualquer efeito sobre os parâmetros convulsivos induzidos pela injeção de PTZ. Os experimentos realizados no presente estudo sugerem que, neste modelo experimental de TCE, o dano oxidativo parece não estar diretamente envolvido na suscetibilidade a convulsões após lesão neuronal uma vez que, a capacidade antioxidante exercida pela creatina não protege das crises convulsivas induzidas por PTZ após TCE.

Palavras chave: creatina; traumatismo cranioencefálico; epilepsia; dano oxidativo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**ANTIOXIDANT EFFECT OF CRETINE DOES NOT PROTECTS AGAINST
SUSCETIBILITY TO SEIZURES AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY
INJURY IN RATS.**

Author: André Luis Lopes Saraiva
Advisor: Luiz Fernando Freire Royes
Date and place of defense: Santa Maria, April 06, 2011.

Studies over recent years have highlighted the important role of creatine in health and in treating various neurological diseases. However, its role in secondary damage induced by traumatic brain injury (TBI) is not fully understood. The aim of this study was to evaluate the effect of creatine supplementation on the oxidative damage and susceptibility to seizures after TBI. For this, we used the model of fluid percussion injury (FPI) in rats, where brain damage is caused by a liquid column that causes a pressure on the dura intact of animal, which was previously exposed. Our results revealed that at 4 and 8 days after TBI, there was increased oxidative damage characterized by increased protein carbonylation and levels of species thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and also there was a reduction in Na^+ , K^+ -ATPase activity. Statistical analysis (two way ANOVA) also revealed that creatine supplementation (300 mg / kg orally), beginning 30 minutes after TBI and continuing until 3, or 7 days after injury, reduced protein carbonylation and TBARS when analyzed at 4 and 8 days after injury. However, creatine supplementation did not protect the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase 4 and 8 days after TBI. Furthermore, the analysis electroencephalographic (EEG) showed that injection of a subconvulsant dose (35 mg / kg, intraperitoneally) of pentylenetetrazol (PTZ), 4 but not 8 days after TBI, decreased latency to the tonic- clonic seizures and increased the time spend in generalized seizure, when compared to the control group. Creatine supplementation had no effect on the convulsive parameters induced by PTZ injection. The experiments in this study suggest that in this experimental model of TBI, oxidative damage seems not to be directly involved in susceptibility to seizures after neuronal injury since the antioxidant capacity exerted by creatine does not protect against PTZ-induced seizures after TBI

Key words: creatine; traumatic brain injury; epilepsy; oxidative damage.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Escala de coma de Glasgow.....	10
Tabela 2. EPT em animais e humanos.....	26
Figura 1. Mecanismos envolvido na patogênese do TCE.....	15
Figura 2. Respostas bioquímicas ao dano primário.....	16
Figura 3. Fatores que podem levar a EPT.....	25
Figura 4. Modelos animais de EPT.....	28

4. ARTIGO

Figure 1. Study design.....	48
Figure 2. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg) for 3 and 7 days after TBI on total protein carbonylation and TBARS levels.....	49
Figure 3. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg) for 3 and 7 days after TBI on Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity.....	50
Figure 4. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg) on the onset latency for generalized seizure induced by subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg) and time spend convulsions. In this figure also represented typical electrographics registers after administration of PTZ.....	51
Figure 5. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg) on the onset latency for generalized seizure induced by subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg). In this figure also represented typical electrographics register after administration of PTZ.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionico
ATP	Adenosina difosfato
BHE	Barreira hemato-encefálica
CK	Creatina Kinase
COX	Ciclooxigenase
Cr	Creatina
DAE	Drogas anti-epilépticas
EEG	Eletroencefalograma
EPT	Epilepsia pós-traumática
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCE	Fluido cerebro-espinhal
GAMT	Guanidinoacetato metiltransferase
I-CAM	Moléculas de adesão intracelular
LPF	Lesão por percussão de fluido
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
PCr	Fosfocreatina
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema nervoso central

SOD	Superóxido dismutase
TAD	Trauma axonal difuso
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo crânioencefálico
V-CAM	Moléculas de adesão vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
SUMÁRIO.....	XI
APRESENTAÇÃO.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Objetivos Específicos.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO.....	8
3.1.1. Definição e Dados Epidemiológicos.....	8
3.1.2. Classificação do TCE.....	9
3.1.2.1. Classificação do TCE em Quanto a Gravidade da Lesão.....	9
3.1.2.2. Classificação do TCE em Quanto ao Tempo de aparecimento da Lesão.....	10
3.1.2.3. Classificação do TCE em Quanto ao Tipo de Impacto.....	11
3.1.2.4. Classificação do TCE em Quanto a Distribuição da Lesão.....	11
3.1.3. Trauma Axonal Difuso.....	12
3.1.4. Patofisiologia do TCE.....	13
3.1.4.1. Dano Primário.....	13
3.1.4.2. Dano Secundário.....	13
3.1.4.3. Resposta Inflamatória.....	13
3.1.4.4. Reparo e Regeneração.....	14
3.1.5. TCE: Radicais Livres e Respostas Biomoleculares	16
3.2. CREATINA.....	18
3.2.1. Dados Gerais.....	18

3.2.1.1. Síntese.....	18
3.2.1.2. Transporte.....	19
3.2.1.3. Sistema CK-PCr.....	19
3.2.2. Creatina e Manutenção do Estado Energético do Encéfalo.....	20
3.2.3. Efeitos da Cr Sobre o SNC não Relacionados ao Estado Energético.....	21
3.2.4. Creatina e TCE.....	22
3.3. EPILEPSIA PÓS-TRAUMÁTICA.....	22
3.3.1. Conceito.....	23
3.3.2. Prevalência, Incidência e Fatores de Risco.....	23
3.3.3. Epileptogênese Pós-Traumática.....	24
3.3.4. Modelos de Animais de EPT.....	25
3.3.4.1. Lesão por Percussão de Fluido.....	27
3.3.5. EPT e Espécies Reativas de Oxigênio.....	28
3.3.6. Na⁺, K⁺-ATPase.....	29
4. ARTIGO.....	31
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

APRESENTAÇÃO

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Traumatismo crânio encefálico (TCE) é um sério distúrbio comumente causado por acidentes de carro, eventos relacionados a esportes ou devido à violência. Medidas preventivas são altamente recomendadas para reduzir o risco e o número de casos de pessoas que sofrem TCE. O termo TCE é definido como uma agressão ao encéfalo de natureza física e não congênita, que pode produzir um estado alterado de consciência e que pode resultar em comprometimento das habilidades cognitivas ou físicas. Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (Center For Disease Control and Prevention-2001) TCE é uma epidemia silenciosa, responsável pela morte de 50 mil pessoas por ano nos Estados Unidos e provoca prejuízos em outras 50-70 mil.

As lesões encefálicas produzidas pelo TCE podem ser divididas, de acordo com o tempo de aparecimento da lesão, em dano primário e dano secundário. O dano primário é resultado de um imediato rompimento do tecido cerebral, enquanto que dano secundário é de natureza mais lenta e progressiva e é resultado de uma série de eventos celulares desencadeados pelo dano primário (SILVER *et al.*, 2005). Além disso, é importante perceber que o TCE é um distúrbio heterogêneo com conseqüências clínicas, patológicas e moleculares complexas e que dependem de uma série de fatores, como por exemplo, características da lesão (gravidade, localização), características do paciente (idade, raça, doenças pré-existentes) e tempo em que as conseqüências são avaliadas.

Além de prejuízos motores e comportamentais apresentados pelos pacientes após TCE, uma seqüela comum é a epilepsia pós-traumática (EPT). A EPT refere-se à condição em que convulsões espontâneas e recorrentes passam a ocorrer, a partir de uma semana após a lesão, em pacientes que sofreram TCE (PITKANEN & McINTOSH, 2006). Durante o período latente, entre o momento da lesão e o aparecimento do primeiro episódio convulsivo, numerosas anormalidades se desenvolvem em resposta ao dano, incluindo alterações na expressão de receptores de neurotransmissores, neurodegeneração, neurogênese e dano axonal. Porém, ainda não se chegou a nenhum consenso sobre qual destas, e de outras alterações, são

responsáveis pelo desenvolvimento de EPT (KHARATISHVILI & PITKÄNEN, 2010).

Uma hipótese a ser considerada na gênese da EPT, é a formação de espécies reativas. Após a lesão tecidual inicial, há um rápido aumento dos níveis de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato (WEBER, J.T., 2004), o que provoca um grande influxo de cálcio para o interior da célula, com a conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por via mitocondrial, e espécies reativas de nitrogênio (ERN), via formação de óxido nítrico (NO). O dano oxidativo é um importante componente que acompanha o dano secundário após TCE. Além disso, há uma série de evidências contribuindo para o fato de que o dano oxidativo é um fator que contribui para o dano neuronal, causando convulsões (PATEL, 1996; MacGREGOR *et al.*, 1996). De fato, recentes evidências têm sugerido que o estresse oxidativo atinge um grande número de processos metabólicos que podem contribuir para excitabilidade neuronal e potencialmente ser um mecanismo ativo para o desenvolvimento de epilepsia (WALDBAUM *et al.*, 2010). Porém, existe outra variedade de estudos que fornecem evidências demonstrando que não existe uma relação direta entre dano oxidativo e epilepsia (MILATOVIC *et al.*, 2001; SLEVEN *et al.*, 2006). Assim, embora existam vários estudos mostrando a função do estresse oxidativo nas convulsões, pouco se sabe se ele é causa ou conseqüência do desenvolvimento da EPT.

Além disso, atualmente, os tratamentos disponíveis visam apenas suprimir ou prevenir as convulsões, sendo que ainda muitos pacientes permanecem refratários as drogas convencionais existentes (KHARATISHVILI & PITKÄNEN, 2010). Assim, torna-se importante testar diferentes compostos que possam ser usados no tratamento da EPT.

Creatina (N-[aminoiminomethyl] glicina N-metil) é um aminoácido endogenamente produzido a partir de glicina, metionina e arginina, nos rins, fígado e pâncreas. A suplementação com de Cr é utilizado por muitos atletas para melhorar o desempenho físico. Além da concentração total deste aminoácido no músculo, níveis elevados de Cr também são encontrados no encéfalo (MUJIKKA & PADILLA, 1997). Embora muitos dos mecanismos moleculares ainda não estejam bem compreendidos, a suplementação de Cr tem sido proposta como um tratamento neuroprotetor, em uma variedade de

modelos animais e celulares de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e Huntington (ADHIHETTY & BEAL, 2008). Além disso, foi demonstrado que um tratamento prévio com Cr reduz o dano tecidual relacionado ao TCE em um modelo de impacto cortical controlado (SULLIVAN, *et al.* 2000). Os mecanismos subjacentes a neuroproteção induzida por Cr pode implicar na manutenção da integridade mitocondrial e a conseqüente redução da produção de espécies reativas, ou pode ser devido ao aumento dos estoques de fosfocreatina celular. Além disso, há relatos indicando que a disfunção mitocondrial é um evento-chave na cascata de eventos apoptóticos e necróticos, levando à morte celular em doenças neurológicas, como o TCE (SULLIVAN *et al.*, 2005; ALBENSI *et al.*, 2000). Desta forma, torna-se importante avaliar os efeitos do tratamento com Cr após o TCE, uma vez que parece existir uma relação entre TCE, dano oxidativo e EPT.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral de nosso estudo foi avaliar o efeito da suplementação aguda com creatina (Cr), após TCE, sobre o dano oxidativo e suscetibilidade a convulsões, procurando estabelecer uma possível relação entre os dois parâmetros.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Verificar o efeito da suplementação com Cr (300 mg/kg, v.o.), por 3 e 7 dias consecutivos após TCE, sobre a carbonilação protéica e peroxidação lipídica (representada pelo conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico- TBARS) e, também, sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase;
- b) Avaliar o efeito da suplementação com Cr, por 3 e 7 dias consecutivos após TCE, sobre a suscetibilidade a convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ, 35 mg/kg), pela observação de alterações comportamentais e eletroencefalográficas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO

3.1.1. Definição e dados epidemiológicos

O traumatismo craniano tem atingido a humanidade desde o início da civilização. Escritos de Hipócrates fazem referência ao uso do trépano, instrumento utilizado para perfurar ossos, em particular ossos do crânio. Além disso, ainda nestes escritos, existiam relatos sobre a prática neurocirúrgica para melhorar as conseqüências causadas pelo trauma craniano. Embora os mecanismos mais comuns tenham mudado desde a antiguidade, de assaltos para acidentes com veículos automotores, dados epidemiológicos dos Estados Unidos revelam que o TCE, entre os vários tipos de trauma, ainda permanece como a maior causa de morbidade e corresponde a cerca de 1/3 de todas as mortes causadas por traumas (JAGER *et al.*, 2000)

Por definição, TCE abrange todo conjunto de processos que, sozinhos ou em combinação, podem danificar o encéfalo com uma lesão de natureza física produzida por ação violenta (SILVER *et al.*, 2005). Os Estados Unidos estimam que cerca de 1,1 milhão de pacientes são avaliados a cada ano nos departamentos de emergência de TCE agudo. Além disso, estes estudos ainda relatam que este tipo de trauma é mais freqüente em pessoas jovens com média de idade entre 15 a 24 anos de idade. Outras idades que também apresentam maiores índices de incidência é 5 e 85 anos de idade (SILVER *et al.*, 2005).

No Brasil, anualmente, 500 mil pessoas requerem hospitalização devido a traumatismos cranianos e destas, 75 a 100 mil morrem no decorrer de horas, enquanto outras 70 a 90 mil desenvolvem perda irreversível de alguma função neurológica. Neste país, o TCE é, em sua maioria, causado pelos acidentes de trânsito, mergulhos em águas rasas, agressões, quedas e projéteis de armas de fogo.

Embora os estudos epidemiológicos sobre TCE forneçam importantes dados sobre esta condição, se deve ter muito cuidado ao avaliar as informações disponíveis na literatura. Entre estas informações, existem muitas

diferenças metodológicas o que torna problemática uma comparação direta entre elas. Muitos estudos diferem nos parâmetros de como um ferimento encefálico é definido, nos métodos de análise dos casos e na maneira pela qual as informações são coletadas e categorizadas. Alguns estudos, por exemplo, incluem pacientes tratados nos departamentos de emergência e em seguida liberados para observação ambulatorial. Já outros, incluem somente pacientes que passaram por unidades de cuidado intensivo. Além disso, ainda existem estudos que excluem os pacientes com morte imediata ou morte após a chegada nos departamentos de emergência. Desse modo, é importante entender as definições de casos e a maneira pela qual as informações foram obtidas para que se possa comparar seus resultados e tornar os dados mais fidedignos ao que ocorre na realidade (SILVER *et al.*, 2005)

3.1.2. Classificações do TCE

O TCE pode ser classificado de acordo com a gravidade da lesão, com o tempo de aparecimento do dano (dano primário ou dano secundário), com o tipo de impacto (contato ou aceleração/desaceleração) ou de acordo com a distribuição do dano (focal ou difuso).

3.1.2.1. Classificação do TCE Quanto à Gravidade da Lesão.

Características clínicas específicas são freqüentemente usadas para dividir os ferimentos à cabeça de acordo com sua gravidade. Assim, pesquisadores propuseram a seguinte classificação: brando, moderado e grave (FREY, 2003)

- trauma brando: aquele em que não há fratura do crânio e, o período de amnésia pós-traumática ou perda de consciência duram menos que 30 min.

- trauma moderado: aquele em que pode ou não haver fratura de crânio, com amnésia pós-traumática ou perda de consciência durando mais que 30 min e que não se enquadra em outro critério para que possa ser classificado como trauma grave.

- trauma grave: aquele em que há contusão encefálica, hematoma intracraniano e amnésia com perda de consciência por mais que 24 hs.

Contudo, alguns autores propõem que a perda de consciência e amnésia não são bons parâmetros para classificar a gravidade do trauma, uma vez que nem sempre eles estão associados com ferimentos encefálicos. Assim, para melhor definir a gravidade do dano encefálico, tem sido proposta a utilização de outros métodos como, por exemplo, a utilização de exames de imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética. Além disso, um procedimento bastante aceito para avaliar a gravidade inicial da lesão, é a utilização da Escala de Coma de Glasgow (ECG; Tab.1) a qual se baseia em informações sobre o movimento dos olhos, funções motoras e respostas verbais dos pacientes. Esta escala, útil como indicador prognóstico clínico, fornece importante contribuição para que se padronize a classificação da gravidade do trauma a cabeça.

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 retirarada	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 Glasgow. Escala comumente usada para avaliar em pacientes a gravidade inicial do trauma. (Adaptada de SILVER et al.2005.)

3.1.2.2. Classificação do TCE Quanto ao Tempo de Aparecimento da Lesão

As primeiras classificações da gravidade do TCE baseavam-se em dados clínicos e patológicos dos pacientes. Desse modo, quando o paciente tinha a

capacidade de falar logo após o traumatismo, este trauma era classificado como brando. Porém, em muitos dos pacientes que apresentavam o trauma brando surgiam complicações que muitas vezes levavam o paciente a óbito (SILVER *et al.*, 2005; RAY *et al.*, 2002). A evidência de que muitos pacientes morriam após uma lesão inicial branda permitiu concluir que esta lesão inicial desencadeia uma série de eventos que provocam a piora do quadro clínico do paciente. Assim, as lesões causadas pelo TCE foram classificadas em

- dano primário: é entendido como o resultado das forças mecânicas que atuam para provocar o ferimento encefálico (ferimento ao escalpo, fratura craniana, dano vascular difuso).

- dano secundário: abrange todas as alterações biomoleculares e fisiológicas que acontecem após o dano primário. Embora as forças que provocam o dano primário geralmente ocorrem em menos que 100 milissegundos, os eventos patofisiológicos resultantes são muito mais prolongados e progressivos (SILVER *et al.*, 2005; RAY *et al.*, 2002).

3.1.2.3. Classificação do TCE Quanto ao Tipo de Impacto.

Embora as circunstâncias pelas quais o encéfalo possa ser ferido sejam complexas e diversas, estão ocorrendo grandes avanços no entendimento dos mecanismos pelos quais os ferimentos acontecem após o trauma. Neste contexto, foram definidos dois principais mecanismos de lesão encefálica: dano por contato e dano por aceleração/ desaceleração (NORTJE & MENON, 2004). As lesões devido ao contato resultam ou de um objeto que atinge a cabeça, ou do contato entre o encéfalo e o crânio. Já o ferimento por aceleração/desaceleração resulta do movimento irrestrito da cabeça que leva a tensões de cisalhamento e compressão, sendo as principais conseqüências os hematomas subdurais, os danos generalizados aos axônios neuronais e o rompimento de vasos sanguíneos.

3.1.2.4. Classificação do TCE Quanto a Distribuição da Lesão

Esta classificação baseia-se em estimativas clínicas e radiológicas, sendo que o dano ao encéfalo após o trauma pode ser classificado como dano focal

ou dano difuso (ou multifocal). O dano focal são lesões que se restringem a uma única e pequena porção do encéfalo e são ditas lesões de contato, tendo como causa mais provável as quedas. Por outro lado, dano difuso são lesões comumente causadas por mecanismos de aceleração/desaceleração após acidentes e se distribuem grandemente pelo encéfalo (SILVER *et al.*, 2005).

3.1.3. Trauma axonal difuso (TAD):

TAD é o termo usado para o particular patomecanismo que ocorre no TCE e refere-se ao conjunto de patologias axonais causadas pelo trauma e que levam ao rompimento dos axônios neuronais. TAD é um dano focal ou difuso aos axônios e não é limitado ao momento do impacto, prolongando-se por mais de 24 horas. As principais alterações dos axônios provocadas pelo TAD são inchaço do axolema, bloqueio do transporte axonal, alterações no citoesqueleto consistindo na compactação do neurofilamentos e perda da rede de microtúbulos (OKONKWO & POVLISHOCK, 1999). Interessantemente, TAD não é uma característica exclusiva do trauma grave ocorrendo em toda série de patologias que vão desde o trauma brando ao trauma grave (BLUMBERGS *et al.*, 1995).

Existem algumas teorias sobre os mecanismos pelos quais o trauma inicia o processo de degeneração dos axônios. Tem sido sugerido que o estiramento físico no momento da lesão resulta em dano ao axolema provocando alterações na estrutura da membrana. Com isso, os axônios perdem a capacidade de manter o gradiente iônico fisiológico resultando em mudanças nas concentrações de cálcio, potássio, sódio e cloreto, dentro do axoplasma. Em certas fibras, estas alterações na homeostase iônica podem ativar determinadas proteases que por sua vez, desnaturam a citoarquitetura dos axônios (GENNARELLI, 1996). Porém, uma hipótese alternativa é que o TCE pode, ou mecanicamente, ou funcionalmente, romper as subunidades de neurofilamentos, rompendo com o transporte axoplasmático e dando início ao processo de degeneração axonal (STONE *et al.*, 2000).

Alguns achados experimentais demonstraram que o TAD induz o aparecimento de uma série de alterações histológicas, as quais dependem do tempo de sobrevivência do paciente após o ferimento e que permitem melhor

identificar a progressão da lesão. Em pacientes que sobrevivem por pouco, tempo as lesões aparecem de forma hemorrágica, mas com o tempo resultam no encolhimento dos axônios com a formação de cicatrizes císticas. Por outro lado, pacientes que sobrevivem por maior período de tempo, o inchaço axonal é facilmente verificado em colorações por prata e através de métodos imunohistoquímicos (SHERIFF *et al.* 1994). Embora estes estudos histológicos somente são possíveis de realizar após a morte do pacientes, estudos utilizando exames de imagem estão sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer melhores diagnósticos aos pacientes (PINEDA *et al.* 2007).

3.1.4. Patofisiologia do TCE

3.1.4.1. Dano primário

Geralmente, TCE é provocado por um impacto mecânico externo à cabeça. Este impacto pode provocar lesões a partir de dois mecanismos: lesões por contato e lesões por forças inerciais. Ambas as lesões podem levar à dois padrões distintos de ferimentos caracterizados por dano focal e dano difuso. Assim, lesões por contato causam primariamente ferimentos como fratura de crânio, hematoma epidural e subdural, além de ferimentos ao escalpo. Por outro lado, forças inerciais levam a hematomas intracerebrais e subdurais, além de dano axonal difuso (GRAHAM *et al.*, 1995).

3.1.4.2. Dano secundário

Como descrito anteriormente, desenvolve-se em períodos de horas ou dias após o impacto inicial à cabeça. Este tipo de dano está associado com a síntese e liberação de mediadores neuroquímicos que alteram o fluxo cerebral, homeostase iônica e metabolismo. Além disso, muitos dos mediadores neuroquímicos envolvidos no dano secundário podem ser destrutivos ao tecido do sistema nervoso central e são mediadores alvos no desenvolvimento de estratégias de tratamento das seqüelas causadas pelo TCE (RAY, 2002).

3.1.4.3. Resposta inflamatória

Como em outros tecidos, o trauma ao sistema nervoso central (SNC) induz uma resposta inflamatória. Paradoxalmente, a resposta inflamatória pode levar tanto a uma melhora ou a um agravamento do dano tecidual. Como o processo inflamatório desenvolve-se em paralelo com o dano secundário provocado pelo TCE, muito interesse tem sido dado à inibição de certos componentes inflamatórios de modo a reduzir o dano secundário ao tecido.

Os tecidos do SNC são considerados tecidos que possuem certos “privilégios inflamatórios”. Este conceito é baseado na relativa impermeabilidade, fornecida pela barreira hematoencefálica (BHE), à componentes celulares e moleculares, da resposta inflamatória e imune, durante condições fisiológicas normais. Porém, sob condições inflamatórias, células imunes/inflamatórias podem atravessar a BHE uma vez que, sua permeabilidade está diminuída.

Após a lesão tecidual, há um imediato dano mecânico caracterizado pelo rompimento de membrana celular, de organelas e de vasos sanguíneos, os quais causam morte celular primária devido à hemorragia e isquemia. Além disso, com dano tecidual e o conseqüente extravasamento de produtos sanguíneos e de componentes intracelulares, a formação de ERO e ERN, a ativação de astrócitos e da microglia, propiciam a ativação da resposta inflamatória (JULIET *et al.*, 2008; ROCK & KONO, 2008). Estes eventos iniciais podem então disparar a liberação de vários mediadores pró e antiinflamatórias os quais facilitam o influxo de células inflamatórias periféricas por mudanças nas células endoteliais ou por quimiotaxia. Além disso, o aumento da expressão de moléculas de adesão, tanto vasculares (vascular cell adhesion molecule, V-CAM) quanto intracelulares (intracellular cell adhesion molecule, I-CAM), P-selectinas e gradiente quimiotático (HAUSMANN, *et al.*, 2008), propiciam o extravasamento de células inflamatórias para o tecido do SNC.

3.1.4.4. Reparo e regeneração

Após a lesão, o tecido do SNC, na tentativa de reparar o dano tecidual, inicia uma série de eventos celulares que estimulam a neuroregeneração (Fig 2). A recuperação do dano traumático pode ser facilitada pela presença de uma

série de peptídeos neurotróficos. Rapidamente disponíveis após o TCE, os fatores neurotróficos podem aumentar a plasticidade neuronal, induzir o reparo neuronal e restabelecer as conexões funcionais no encéfalo. Por exemplo, aumento agudo nas concentrações do fator de crescimento do nervo (nerve growth factor- NGF) tem sido relatado após trauma penetrante ao encéfalo, além do aumento de sua expressão após modelo de percussão de fluido (LEONARD et al, 1994). Também foi relatado o aumento do fator neurotrófico derivado do encéfalo (Brain Derived Neurotrophic Factor- BDNF) após lesão por impacto cortical controlado (OYESIKU, *et al.*, 1999).

Os efeitos dos fatores neurotróficos após TCE são tão evidentes, que algumas estratégias terapêuticas estão sendo utilizadas. A administração de NGF, por exemplo, após TCE experimental, reduz a extensão de morte celular apoptótica e melhora as funções cognitivas (SINSON *et al*, 1997).

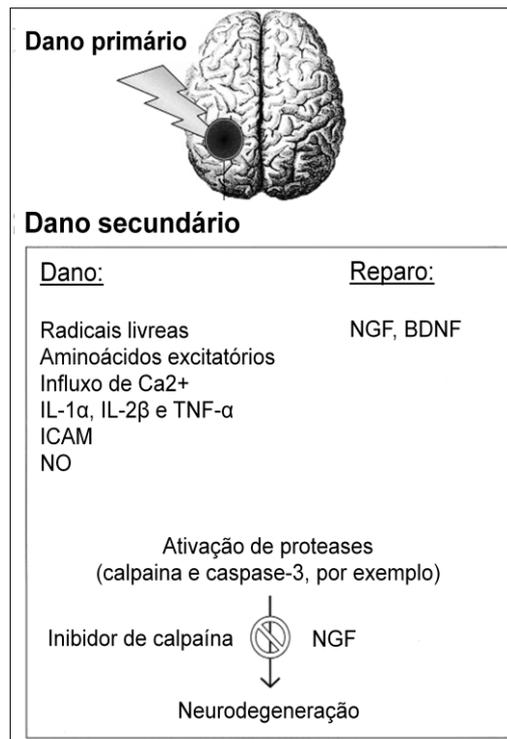


Figura 1- Mecanismos envolvidos na patogênese do TCE. Esquema simplificado dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia do TCE e estratégias para a inibição da neurodegeneração. IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; ICAM, molécula de adesão intracelular; NO, óxido nítrico; NGF, fator de crescimento do nervo; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo. (Adaptado de RAY, 2002.)

3.1.5. TCE: Radicais Livres e Respostas Biomoleculares

Comparado ao dano primário, o dano secundário ao encéfalo pode ser um fator mais decisivo na recuperação do paciente. O dano primário é caracterizado pela destruição do tecido encefálico e não se distribui grandemente pelos neurônios, células gliais ou axônios; estes efeitos tardios são em sua essência causados pelo dano secundário (GENTRY, 1994). Apesar dos numerosos esforços farmacológicos de intervenção no dano secundário, ainda não se dispõe de compostos com eficácia clínica evidente. Claramente há uma ampla janela de oportunidades que podem propiciar melhor recuperação dos pacientes, mas muitas destas intervenções estão a nível celular e subcelular. Um grande número de trabalhos tem fornecido um conjunto de dados sobre as respostas biomoleculares induzidas pelo TCE (Fig.3).

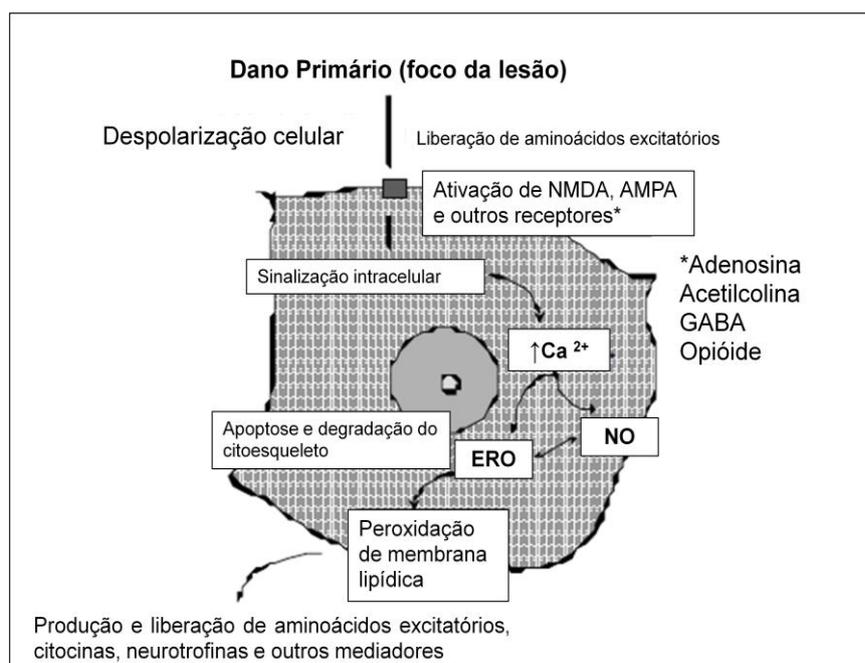


Figura 2- Respostas bioquímicas ao dano primário. Interrelação das principais respostas bioquímicas desencadeadas pelo dano primário após TCE. NMDA e AMPA, receptores de glutamato; ERO, espécies reativas de oxigênio; NO, óxido nítrico. (Adaptado de GREVE et al., 2009)

A resposta celular inicial ao ferimento é uma despolarização massiva dos neurônios e células gliais. Acredita-se, que o excesso de glutamato é a causa da despolarização das células lesadas no TCE. Considerando sua

natureza patológica, o glutamato é um importante contribuidor para a morte e disfunção celular encefálica após TCE. Falha das bombas iônicas pré-sinápticas e a excitotoxicidade provocada pelo cálcio, aumentam as concentrações extracelulares de glutamato; o rompimento da homeostase do cálcio, a despolarização e outros processos celulares, são eventos chave na progressão do dano secundário no TCE (GREVE & ZINK, 2009).

Muitos processos celulares são dependentes das ações do Ca^{2+} . Desse modo, embora Ca^{2+} seja importante para as funções celulares, em excesso este íon pode ser altamente prejudicial, sendo importante que suas concentrações permaneçam em níveis celulares adequados. O excesso de cálcio leva ao rompimento da fosforilação de proteínas, da construção de microtúbulos, além da ativação de proteases e um número de outras enzimas (HAYES & DIXON, 1994). Além disso, o seqüestro de cálcio pode afetar a função mitocondrial. Alta concentração de cálcio pode resultar em inchaço, perda do potencial de membrana e perda da função mitocondrial (VERWEIJ *et al.*, 2000). Isto pode iniciar o processo de morte celular diretamente via apoptose e, indiretamente via perda da fosforilação oxidativa e falha na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (KIM *et al.*, 2003). Como o ATP fornece energia para a grande maioria das funções celulares, incluindo manutenção do gradiente iônico, a incapacidade de gerar ATP é decisivo no processo de morte celular.

O excesso do seqüestro de cálcio pela mitocôndria também leva a geração de espécies reativas ao oxigênio incluindo ânion superóxido e óxido nítrico (SAELENS *et al.*, 2004). Particularmente, o óxido nítrico pode se combinar com ânion superóxido gerado pela mitocôndria para produzir uma substância altamente reativa, o peroxinitrito o qual tem sido mostrado provocar a fragmentação do DNA, peroxidação lipídica, e rompimento de aminoácidos (ARUNDINE *et al.*, 2004). A peroxidação lipídica compromete as membranas celulares, resultando em lise e morte celular. Além disso, a despolarização e o influxo de cálcio resultam em um aumento de ácidos graxos livres e ácido araquidônico. Este último é particularmente metabolizado pela via das ciclooxigenases, produzindo hidroperóxidos lipídicos e radicais livres.

Outro importante processo envolvido na patofisiologia do TCE são as alterações na síntese de proteínas. O dano celular possibilita o aumento na

expressão de certos genes. Modificações pós-transducionais podem produzir mudanças nos níveis de proteínas os quais podem ser detectados no soro ou no fluido cerebrospinal (FCE). Algumas destas proteínas estão sendo usadas como biomarcadores para avaliar a gravidade do TCE. Assim, o entendimento da regulação da síntese de proteínas e respostas seguidas ao TCE pode levar ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas que podem reduzir o dano secundário (KOCHANNEK, 2008).

Embora intervenções em modelos animais tenham fornecido resultados encorajadores, nas triagens clínicas de TCE, as medidas terapêuticas utilizadas para reduzir os efeitos de mediadores do dano, tem sido ineficazes. Além disso, processos como apoptose podem ter efeitos protetores no TCE e assim, em muitos casos, não se pode garantir que a resposta biomolecular é patológica ou benéfica. Além disso, o tecido encefálico não é homogêneo: o que poderia ser benéfico para os neurônios poderia ser patológico para as células gliais.

3.2. CREATINA

3.2.1. Dados Gerais

3.2.1.1. Síntese

Creatina é um composto guanidino primariamente encontrado em carnes e produzido endogenamente pelo fígado, rins e pâncreas. A produção de creatina requer os aminoácidos arginina e glicina. Em seguida, o aminoácido metionina fornece o grupamento metil para estrutura final da molécula. Creatina é inicialmente sintetizada pela conjugação da arginina com glicina através da ação da enzima L-arginina:glicina-amidino transferase (transamidinase) para produzir guanidinoacetato. Este produto é subsequente mente metilado pela S-adenosilmetionina em uma reação catalisada pela enzima guanidinoacetato-metiltransferase (GAMT) resultando no produto final creatina (TARNOPOLSKY & BEAL, 2001).

A importância da Cr para as funções neurológicas normais é claramente demonstrada em pacientes que possuem deficiência inata da GAMT a qual leva a uma baixa biossíntese de Cr. Estes pacientes com deficiência na GAMT apresentam atraso no desenvolvimento, distúrbios motores e convulsões (VAN DER KNAAP *et al*, 2000).

3.2.1.2. Transporte

Creatina é transportada para o interior do encéfalo, coração e músculo esquelético por transportadores dependentes de sódio. Algumas preocupações estão surgindo sobre a possibilidade de que a suplementação exógena de Cr poderia resultar em uma redução do seu transporte. Contudo, dados em humanos, tem mostrado que o transporte de Cr não é reduzido com até 2 meses de suplementação com altas doses deste composto (JUHN & TARNOPLSKY, 1998).

Particularmente, para entrar no encéfalo, a Cr deve passar pela BHE onde existem transportadores de Cr (CrT), os quais são expressos e localizados nas células endoteliais dos microcapilares. Após atravessar a BHE Cr é captada do fluido cérebro-espinhal (FCE) por células que também expressam os CrT como neurônios e oligodendrócito, mas não astrócitos os quais não possuem tais transportadores. Após sua captação Cr irá compor o sistema creatina quinase- fosfocreatina (CK-PCr), formando PCr que é um composto de alta energia utilizado como reserva energética.

3.2.1.3. Sistema CK-PCr

Creatina existe dentro da célula sob duas formas: Cr livre e fosfocreatina PCr, os quais, juntos, formam a quantidade total de creatina nos tecidos. Para tecidos que necessitam de altas quantidades de energia, como músculo esquelético e encéfalo, PCr serve como um tampão energético de curto prazo através da fosforilação da adenosina difosfato (ADP) para a formação da adenosina trifosfato (ATP). A transferência do grupo fosforil é catalisada pela

importante enzima Creatina Kinase (CK) (TARNOPOLSKY & BEAL, 2001). Desse modo CK é um importante mediador da homeostase celular uma vez que, pode reversivelmente converter Cr para PCr criando uma reserva de PCr para a manutenção temporal e espacial das concentrações de ATP (ANDRES *et al*, 2008).

Existem 2 tipos diferentes de CK as quais se distribuem por muitos tecidos e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares. CK citosólica (CKc), encontrada como um dímero e está frequentemente associada à estruturas sub-celulares dentro da célula, e CK mitocondrial (CKmt), encontrada como um dímero ou octâmero está localizada na crista mitocondrial ou no espaço intermembranas da mitocôndria. Além disso, de acordo com o local onde estas isoformas são encontradas, elas podem ainda ser classificadas de duas maneiras: CK sarcomérica (CKs) encontrada no músculo e, CK ubíqua (CKu) encontrada nos demais tecidos. Apesar das diferentes localizações dentro da célula, tanto a isoforma citosólica, quanto a mitocondrial, contribuem para a reserva total de PCr dentro da célula criando um sistema de tamponamento energético.

A importância do sistema da CK para o encéfalo tem sido demonstrada utilizando camundongos geneticamente modificados que não possuem a isoforma citosólica da CK. Estes animais apresentam prejuízos comportamentais em testes de campo aberto, demorado aprendizado e perda das conexões hipocâmpais de fibras musgosas (JOST *et al*, 2002). Estes achados claramente demonstram a importância do sistema da CK. Assim, considerando que muitas doenças neurológicas são caracterizadas pela depleção dos substratos energéticos da célula, isto leva a hipótese de que creatina exógena pode fornecer uma útil intervenção terapêutica em distúrbios neurológicos.

3.2.2. Creatina e Manutenção do Estado Energético do Encéfalo

É importante notar, que o encéfalo, o qual constitui somente 2% da massa corpórea, consome mais que 20 % da energia total do corpo (SHULMAN *et al.*, 2004). Assim, é necessária uma alta reposição de ATP para

manter o potencial elétrico das membranas, bem como as atividades de sinalização do sistema nervoso central e periférico. Desse modo, a produção de energia via fosforilação oxidativa, com a produção de ATP e PCr, é uma função cerebral crítica.

Durante as funções fisiológicas dos neurônios, rápidas mudanças na demanda de ATP ocorrem sendo que as reservas celulares de energia são pequenas. Desse modo, é necessária uma efetiva ligação entre os processos que consomem ATP aos processos que produzem ATP de modo a manter suficientemente alta a transferência de energia. Nos neurônios, os processos celulares estão grandemente distribuídos e localizam-se em locais remotos longe do corpo celular, como por exemplo, nas sinapses. Assim, o sistema CK-PCr tem importante função no metabolismo do ATP neuronal. Além disso, a depleção de creatina está associada a distúrbios da função neuronal como perda da conexão sináptica (IN'T ZANDT, *et al.*, 2004) e, alterações na estrutura mitocondrial, demonstrando inclusões intramitocondriais ricas em CKm, característica típica de condições patológicas graves.

A manutenção do estado bioenergético do encéfalo é extremamente importante. Em humanos, síndromes que afetam ou a síntese, ou o transporte de Cr, apresentam graves sintomas neurológicos como lento desenvolvimento, demora no aprendizado da fala, convulsões e retardo mental. Estas observações fornecem fortes evidências para a importância fisiológica do sistema CK-PCr no funcionamento normal do encéfalo sendo que, maiores estudos devem ser realizados para o melhor entendimento do metabolismo da Cr em humanos.

3.2.3. Efeitos da Cr no SNC não Relacionados ao Estado Energético

Estudos têm demonstrado que alguns efeitos da Cr não são muito bem explicados pelos seus efeitos energéticos, sendo que a Cr parece possuir efeitos adicionais no SNC. Efeito antiapoptótico da Cr tem sido relatado. Em combinação com a CKm, Cr previne ou atrasa a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, um evento tipicamente relacionado a apoptose (O'GORMAN *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrado que Cr possui

efeitos antioxidantes via sequestro direto de radicais livres (SESTILE *et al.*, 2005) ou, alternativamente, reduzindo a produção mitocondrial de espécies reativas. Este último efeito deve-se ao efeito estimulatório da mitocôndria fornecido pela Cr que permite uma eficiente reciclagem de ADP dentro da mitocôndria facilitando o acoplamento da respiração mitocondrial com a síntese de ATP e supressão da formação de espécies reativas (MEYER *et al.*, 2006). Outro efeito neuroprotetor da Cr, independente de mudanças bioenergéticas, é seus efeitos sobre a vasculatura cerebral melhorando a circulação sanguínea (PRASS *et al.*, 2007).

3.2.4. Creatina e TCE

Quando o encéfalo ou medula espinhal sofrem uma lesão, é iniciada uma série de eventos celulares e moleculares no tecido lesado resultando em grande dano ao redor da área lesada a qual é chamada de área de penumbra. O dano secundário é geralmente mais extenso que o dano primário, em parte, devido ao processo isquêmico e comprometimento da bioenergética celular. Em modelos experimentais de TCE, a Cr tem fornecido neuroproteção em uma série de estudos (SCHEFF & DHILLON, 2004; SULLIVAN *et al.*, 2000). Em estudo prospectivo e randomizado, a administração de Cr em crianças e adolescentes, que sofreram TCE, resultou em significativa melhora clínica dos prejuízos cognitivos (SAKELLARIS, *et al.*, 2006).

Porém, apesar dos evidentes efeitos da Cr, surgem algumas dificuldades em relação ao seu uso clínico para o tratamento das conseqüências induzidas pelo TCE. Por exemplo, é pouco provável que pacientes se beneficiem do uso de Cr devido ao seu lento transporte para dentro do SNC após suplementação oral (IPSIROGLU *et al.*, 2001). Desse modo, outras vias devem ser avaliadas de modo que se tenha um rápido aumento nas concentrações encefálicas de Cr (REBAUDO, *et al.*, 2000).

3.3. EPILEPSIA PÓS-TRAUMÁTICA

3.3.1. Conceito

Epilepsia pós-traumática (EPT) é definida como uma ou mais convulsões espontâneas que ocorrem tardiamente (ao menos 1 semana) após TCE, (FREY, 2003). Embora o exato diagnóstico da epilepsia deve ser limitado à pacientes com ao menos 2 convulsões espontâneas, uma definição mais ampla é justificável uma vez que muitos estudos são limitados a ocorrência de apenas uma convulsão. Além disso, após a identificação do insulto inicial ao encéfalo, existe um intervalo de tempo até o surgimento dos sintomas clínicos da primeira convulsão. Durante o período latente, numerosas anormalidades se desenvolvem em resposta ao ferimento, incluindo alteração na expressão de receptores de neurotransmissores, neurodegeneração, dano axonal, resposta inflamatória, dano à BHE e angiogênese. Porém, ainda não existe nenhum consenso sobre qual das alterações observadas é a responsável pelo desenvolvimento da EPT. Além disso, existem muitas informações disponíveis sobre fatores genéticos e outros fatores de risco que devem ser considerados durante a evolução da EPT (KHARATISHVILI & PITKÄNEN, 2010).

3.3.2. Prevalência, Incidência e Fatores de Risco

O risco de se desenvolver epilepsia após o trauma parece estar relacionado à gravidade da lesão. Em estudos epidemiológicos, durante a fase aguda do trauma, os pacientes são tipicamente agrupados, de acordo com a escala de coma de Glasgow (ECG), em brando, moderado e grave. De acordo com estudos de grandes centros, 17% dos pacientes com TCE com ECG entre 3-8, 24% com ECG entre 9-12 e 8% com ECG entre 13-15 desenvolvem EPT dentro de 24 meses após o ferimento inicial (EGLANDER, *et al.*, 2003). Alguns que sofreram algum dano penetrante ao encéfalo apresentam a probabilidade de 53% de desenvolver epilepsia (FREY, 2003). Outros fatores de risco para desenvolvimento de EPT é a ocorrência de convulsões com menos de uma semana após o trauma. São também fatores de risco para o desenvolvimento

de EPT fraturas cranianas com perfuração da duramáter, hematoma intra-encefálico agudo, hematoma subdural com remoção cirúrgica, contusões múltiplas ou bilaterais, epilepsias espontâneas e recorrentes, perda de consciência por mais que 24 hs (ENGLANDER, *et al.*, 2003). Muitos destes fatores refletem a gravidade do ferimento inicial, mas sua relação com o processo epileptogênico ainda permanece desconhecida.

A idade também é reconhecida como um fator de risco para o TBI. Aproximadamente 10% das crianças com TCE grave desenvolvem epilepsia (HERMAN, 2002). O risco de EPT em pessoas com mais de 65 anos de idade é 2,5 vezes maior do que o da população jovem (FREY, 2003).

Contudo, ainda não está claro se certos tipos de ferimentos ou alguma patologia, ou ainda, a combinação de patologias agudas, são mais comuns em pacientes que desenvolvem EPT. Também permanece desconhecida a contribuição de fatores genéticos, doenças pré-existentes ou tratamentos imediatos ao TCE em unidades de cuidados intensivos, para o desenvolvimento de EPT. Porém, a latência de vários meses a anos, desde o TCE até o surgimento da epilepsia, indica que a epileptogênese progride em paralelo com o avanço do dano secundário, bem como com o processo de recuperação pós-traumática.

3.3.3. Epileptogênese Pós-Traumática

Epileptogênese refere-se à um conjunto de eventos celulares e moleculares que são disparados por um insulto, como TCE, e eventualmente levam a ocorrência de convulsões recorrentes que é a epilepsia. Epileptogênese refere-se à um processo dinâmico que progressivamente altera a excitabilidade neuronal, estabelece interconexões críticas e que, talvez, requer mudanças críticas antes das primeiras convulsões espontâneas; entre estas alterações estão a neurogênese, gliose, dano e crescimento axonal, plasticidade dendríticas, dano a BHE, reorganização da matriz extracelular e da arquitetura molecular (Fig.3).

Após a primeira convulsão pós-traumática, 86% dos pacientes desenvolvem uma segunda convulsão dentro de 2 anos; quase 90% dos

pacientes tem ao menos 5 convulsões dentro de 2 anos a partir da primeira convulsão (HALTINER *et al.*, 1997). A latência para o primeiro episódio convulsivo parece estar relacionada com a gravidade da lesão. Desse modo, 25% dos pacientes, com contusões múltiplas, desenvolvem epilepsia em aproximadamente 6 meses. Em casos de contusões únicas, 8% dos pacientes desenvolvem epilepsia dentro de 10 meses. Além disso, uma segunda convulsão espontânea tende a aparecer mais rápida em pacientes com latência mais curta para a primeira convulsão (HALTINER *et al.*, 1997).

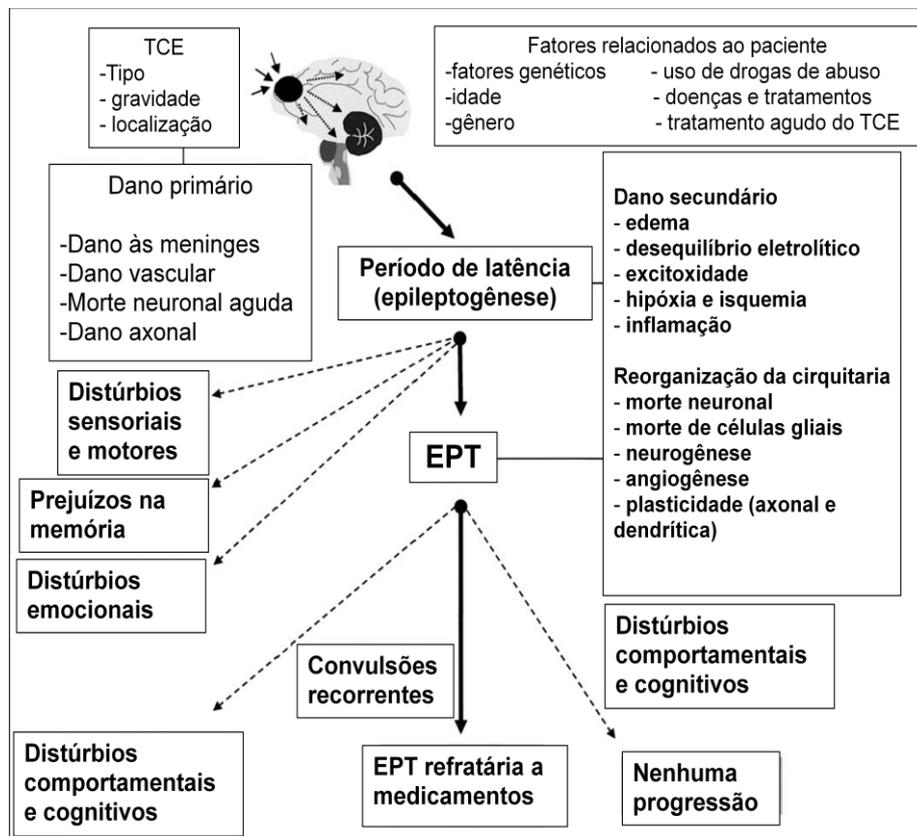


Figura 3- Fatores que podem levar à EPT. Resumo dos fatores que atuam durante o curso do processo epileptogênico e que podem levar à EPT. (Adaptado de PITKÄNEN & McINTOSH, 2006.)

3.3.4. Modelos Animais de EPT

Por definição, epilepsia é a condição caracterizada por convulsões espontâneas e recorrentes que é causada por atividade elétrica encefálica anormal. Desse modo, em um modelo de EPT, convulsões espontâneas devem

se desenvolver após o TCE. Além disso, a necessidade de se demonstrar convulsões crônicas recorrentes e espontâneas também torna necessário o uso de animais “inteiros”, ao invés de fatias de tecido ou culturas celulares. Contudo, o valor das preparações *in vitro* não pode ser subestimado, uma vez que fornecem valiosas informações sobre alguns componentes do processo epilético associado com a EPT, que pode não ser acessível em animais inteiros. Modelos animais usados para disparar a hiperexcitabilidade em animais possuem eficácia e aplicabilidade clínica variável. Em modelos mais antigos, o objetivo era gerar um insulto que se tornaria hiperexcitável com o tempo. Isto foi tipicamente alcançado com a aplicação cortical de metais como alumínio, cobalto ou ferro (WILLMORE *et al.*, 1978). Apenas recentemente estão sendo usados modelos que produzem EPT em ratos e que são mais relevantes clinicamente, reproduzindo as mesmas características patológicas do TCE humano (Tab. 2; Fig. 4)

Embora nenhum modelo de TCE reproduza completamente as síndromes humanas, é bem aceito que estes modelos são úteis para o entendimento dos mecanismos moleculares do TCE e para que se possa testar novos tratamentos para este distúrbio.

	LPF em ratos	
	lateral	Parassagital
período de latência	1-11 meses	1-2 semanas
convulsões espontâneas	43-50%	100%
características das convulsões	parciais e generalizadas	Parciais
frequência das convulsões	0,3 convulsões/dia	acima de 7 convulsões/hora
duração das convulsões	113 segundos em média	aprox. 10 s

Continuação:

ICC		queda de peso	
ratos	camundongos	ratos	EPT em humanos
não avaliado	não avaliado	não avaliado	2 anos em 86% dos pacientes
13%	20-36%	88%	acima de 35%
generalizadas	parciais	hioerexcitabilidade persistente	parciais e generalizadas
não avaliada	não avaliado	não avaliado	não avaliado
aprox. 60 s	aprox. 90 s	não avaliado	não avaliado

Tabela 2- EPT em animais e humanos. Ocorrência e características da EPT em diferentes modelos animais, comparado com humanos. LPF (lesão por percussão de fluido); ICC (impacto cortical controlado); EPT (epilepsia pós-traumática). (Adaptada de KHARATISHVILI & PITKÄNEN, 2010)

3.3.4.1. Lesão por Percussão de Fluido (LPF)

Lesão por percussão de fluido é o mais utilizado modelo de EPT. Estudos têm mostrado que LPF inicia um conjunto de alterações neurobiológicas que contribuem para a reorganização neuronal resultando no desenvolvimento de epilepsia, além de provocar morte neuronal, gliose, crescimento axonal e neurogênese (THOMPSON *et al.*, 2005). Estes dados fornecem a base para a hipótese de que a LPF dispara a epileptogênese e leva ao desenvolvimento de epilepsia.

Estudos de vídeo-monitoramento demonstram que, 11 meses após a lesão inicial, cerca de 50% dos animais desenvolvem epilepsia. O período de latência varia de 6 semanas a 11 meses. Os registros eletroencefalográficos detectam as primeiras alterações no hipocampo ipsilateral; o córtex contralateral também é rapidamente atingido. Além disso, estudos tem investigado a excitabilidade hipocampal por mais de 3 meses após a lesão. A duração média das convulsões nos animais que desenvolveram epilepsia é de aproximadamente 85 segundos. Estudos histológicos demonstram que animais mortos 11 meses após a LPF grave, apresentam perda neuronal que foi mais acentuada no lado ipsilateral.

Ao se avaliar a validade do LPF como modelo clínico de TCE, ele deve abordar aspectos conhecidos da lesão em humanos. Lesões fechadas a cabeça em humanos resultam em alterações biomecânicas, fisiológicas, neurológicas e morfológicas a partir do dano primário. Embora outros modelos experimentais parecem replicar melhor os mecanismos envolvendo o dano primário do TCE, as conseqüências patofisiológicas e os prejuízos funcionais após LPF representam uma lesão a cabeça que se parecem exatamente com as características clínicas do TCE em humanos. Vários aspectos do TCE humano, incluindo contusão focal, hemorragia subaracnóidea e dano axonal são representados pelo LPF. Outras seqüelas do TCE humano incluem dano a BHE, alterações no fluxo sanguíneo cerebral, perda neuronal, alterações no metabolismo da glicose, liberação de aminoácidos excitatórios e nível alterado de consciência também são reproduzidos pelo LPF. Embora LPF, como muitos modelos experimentais, não reproduzem completamente a natureza

heterogênea e multifacetada do TCE humano, existe uma distinta correlação entre as seqüelas clínicas e pré-clínicas fornecidas pelo LPF e o TCE humano.

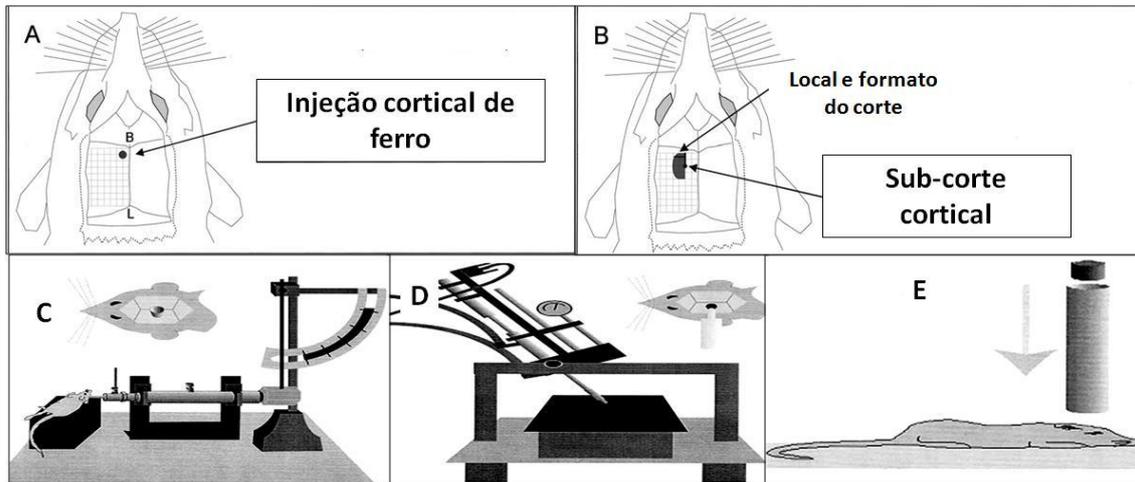


Figura 4- Modelos animais de EPT. Desenhos esquemáticos de modelos experimentais de EPT. Injeção cortical de ferro (A); sub-corte cortical (B); lesão por percussão de fluido (C); impacto cortical controlado (D); lesão por queda de peso (E). (Adaptado de MORALES et al., 2005 e PITKÄNEN & McINTOSH, 2006.)

3.3.5. EPT e Espécies Reativas de Oxigênio

Após TCE, várias são as origens de ERO. Contusões corticais, por exemplo, causam sangramento seguido de hemólise dos eritrócitos sanguíneos com conseqüente deposição de hemoglobina. Desse modo, o ferro (Fe) é liberado propiciando a deposição de hemosiderina, comumente encontrada em pacientes que sofreram TCE (PAYAN *et al.*, 1970). A formação de radicais livres de ferro, adicionados a soluções que contem altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), ou a suspensão de organelas subcelulares, resulta na formação de espécies altamente reativas como radical superóxido, íons perferril e radicais hidroxila (WILLMORE *et al.*, 1983). Estas espécies reativas geradas reagem com AGPI propagando reações de peroxidação lipídica, o que causa o rompimento das membranas celulares. Outra origem de radicais livres após o trauma ocorre a partir da liberação de glutamato.

Os radicais livres, de diferentes origens, podem contribuir para o dano neuronal seguido da isquemia e hemorragia cerebral após TCE e, além disso, podem estar envolvidos na degeneração de neurônios que ocorrem neste distúrbio e também na epilepsia. Uma série de relatos tem demonstrado uma possível correlação entre radicais livres e o processo epileptogênico. ERO, por exemplo, aceleram a produção de compostos guanidinos endógenos neurotóxicos que podem induzir convulsões (MORI, 1996); por outro lado, óxido nítrico produzido a partir da liberação de glutamato pode causar dano neuronal e provocar convulsões em modelos experimentais com PTZ (BASHKATOVA *et al.*, 2000; MURASHIMA *et al.*, 2000).

Assim, o entendimento de como o TCE leva a epilepsia é uma necessidade crítica. O entendimento das sequências específicas responsáveis pela epileptogênese poderia levar a métodos de intervenção que poderiam diminuir o dano encefálico em pacientes que sofreram TCE. Porém, embora ainda não se tenha realmente demonstrado, as EROs parecem ter importantes contribuições durante o desenvolvimento do processo epileptogênico. Portanto, devido à escassez de medidas terapêuticas efetivas no controle e no desenvolvimento da EPT, evidencia-se a importância da busca da compreensão da fisiopatogênese da doença para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3.3.6. Na⁺, K⁺-ATPase

A bomba de Na⁺, mais comumente chamada de Na⁺,K⁺-ATPase é uma enzima ligada a membrana plasmática a qual catalisa a hidrólise do ATP, acoplado a esta hidrólise o transporte de 3 íons Na⁺ do meio intracelular para o meio extracelular e, o transporte de 2 íons K⁺ do meio extracelular para o meio intracelular. A enzima é constituída por 3 cadeias polipeptídicas denominadas α , β e γ , sendo que a unidade funcional da enzima é constituída pela subunidade α e pela subunidade β .

Embora tenha sido descoberta a mais de 50 anos atrás, a enzima ainda continua atraindo a atenção dos pesquisadores. Logo após sua descoberta,

muitos esforços foram feitos na tentativa de desvendar a estrutura e função da enzima. Porém, agora muita atenção tem sido dada sobre os mecanismos pelos quais a enzima tem sua função modulada.

A regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo, pelo aumento na biossíntese de novas isoformas da enzima em um longo processo que pode levar horas ou até mesmo dias. Por outro lado, a regulação mais rápida da enzima pode ser alcançada através de mecanismos de fosforilação por diferentes proteínas quinases (LOPINA, 2001). Além disso, existem evidências demonstrando que radicais livres podem estar relacionados com a morte neuronal (DAWSON & DAWSON, 1996) e com a inativação da enzima; como a enzima é uma proteína integral de membrana, ela é um alvo fácil ao ataque de radicais livres na membrana lipídica, principalmente no cérebro, uma estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais são altamente suscetíveis a peroxidação lipídica.

O estudo dos mecanismos de modulação da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase tem recebido grande interesse devido ao fato da importante e variada função que a enzima exerce em muitos tecidos biológicos. Na^+, K^+ -ATPase tem a função de criar um gradiente de Na^+ e K^+ o qual é utilizado de diferentes maneiras em diferentes tecidos. Em todas as células animais Na^+, K^+ -ATPase participa da manutenção do potencial de repouso das células ou da manutenção e regulação do volume celular. Assim, de grande importância é a função que Na^+, K^+ -ATPase tem na manutenção da condutividade iônica em tecidos excitáveis (neurônios e tecido muscular). Particularmente no cérebro, a enzima contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e de ação além, da captação e liberação de neurotransmissores (STAHL & HARRIS, 1986). Conseqüentemente, o mau funcionamento da enzima ocasiona um aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição apresentado (GRISAR et al., 1992). Além disso, o mau funcionamento da enzima Na^+, K^+ -ATPase tem sido associado à epilepsia. Em pacientes epiléticos, por exemplo, observa-se um decréscimo na atividade em tecido cerebral, facilitando a propagação da onda de despolarização (GRISAR et al, 1992).

The antioxidant effect exerted by Creatine does not protect against seizure development after severe traumatic brain injury

André Luis Lopes Saraiva^{1,2}, Ana Paula Oliveira Ferreira^{1,2}, Luiz Fernando da Silva Almeida^{1,2}, Maurício Scopel Hoffmann², Fabrício Diniz Dutra², Carlos Fernando de Mello³, Luiz Fernando Freire Royes^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Métodos e Técnicas Científicas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author: Luiz Fernando Freire Royes

Departamento de Métodos e Técnicas Científicas
Centro de Educação Física e Desportos
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.
FAX: +55 55 3220 8031
e-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

ABSTRACT

Achievements made over the last years have highlighted the important role of creatine in health and disease. However, studies of its effect on hyperexcitable circuit and oxidative damage induced by traumatic brain injury (TBI) are not well understood. In the present study we revealed that severe TBI induced by fluid percussion brain injury (FPI) induced oxidative damage characterized by protein carbonylation, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) increase and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition, 4 and 8 days after neuronal injury. Statistical analysis revealed that, after FPI, the creatine supplementation (300 mg/kg, p.o.) decreased the levels of protein carbonyl and TBARS but not protected against TBI-induced Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition. Electroencephalography (EEG) analysis revealed that the injection of subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.), 4 but not 8 days after neuronal injury, decreased latency for first clonic seizures and increased the time of spent generalized tonic-clonic seizures when compared with sham group. In addition, the supplementation of creatine did not have any effect on the parameters convulsive induced by subconvulsant dose of PTZ (35 mg/Kg). The current experiments provide evidence that oxidative stress represents separate pathway in the early post-traumatic seizures. Furthermore, the lack of consistent anticonvulsant effect exerted by creatine suggests that the ability antioxidant exerted by this compound does not protect against excitatory inputs generation induced by TBI.

Key words: creatine, traumatic brain injury, posttraumatic epilepsy, TBARS, carbonyl, Na⁺,K⁺-ATPase.

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is a heterogeneous disorder characterized by clinical consequences multifaceted and complex (Pitkänen et al. 2009). TBI-induced damage can be classified in primary damage induced by direct mechanical force to the head occurring at the time of injury and secondary damage characterized by complications starting during the first minutes, hours, and days after the injury (Pitkänen et al. 2009). In line with this view, it has been demonstrated that numerous abnormalities after the injury induce alterations in brain excitability and spontaneous seizures or epilepsy (McKinney et al., 1997; Pitkänen et al., 2009). Clinically, post-traumatic epilepsy (PTE) refers to the condition where recurrent spontaneous seizures occur more than 1 week after TBI (Frey, 2003; Pitkänen and McIntosh, 2006). Considering that patients with early seizure have a high risk of late epilepsy, there is great need for the identification of biomarkers that provide quantitative measures of the process of post-traumatic epileptogenesis.

In this context, recent studies have suggested that oxidative stress, an imbalance between oxidants and antioxidant, is a significant component of the secondary injury cascade that accompanies TBI (Oppi et al., 2007; Wu et al., 2006). Although several evidence supporting the idea that any cellular constituent may be a target for free radical damage, the inhibition of the some selected target such as $\text{Na}^+,\text{-K}^+\text{-ATPase}$ may play an important role in the hyperexcitability induced by TBI (Lima et al., 2009). In fact, the $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPase}$ is membrane bound enzyme, known to play a pivotal role in cellular ionic gradient maintenance and is particularly sensitive to reactive species (Morel et

al., 1998). However, little information is available regarding the role of oxidative stress and Na^+, K^+ -ATPase enzyme in seizure development after severe TBI.

Creatine (N-[aminoiminomethyl]-N-methyl glycine) is a guanidine compound endogenously produced from glycine, methionine, and arginine in the liver, kidney, and pancreas. Dietary supplementation of creatine monohydrate is used by many athletes to enhance performance. In addition to the pool of creatine in the muscle, high levels of creatine are found in the brain (Mujika and Padilla, 1997). Although many of molecular mechanisms are not well understood, creatine supplementation has been proposed and/or proven partially in a variety of animal/cellular models of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's (Adhihetty and Beal, 2008). In addition, has been shown that creatine pre-treatment reduces TBI-related tissue damage in cortical controlled impact (CCI) model (Sullivan et al., 2000). The mechanisms underlying the creatine-induced neuroprotection may involve the maintenance of mitochondrial integrity and the consequent decrease in production of reactive species, or may be due to increased stores of cellular phosphocreatine. However, the role of creatine in process of post-traumatic epileptogenesis has not been evaluated to date. Therefore, the purpose of this study was to investigate the involvement of free radicals and Na^+, K^+ -ATPase activity in the process of post-traumatic epileptogenesis and the role of early creatine administration in this deleterious effects.

MATERIALS AND METHODS

Animal and reagents

Adult male Wistar rats (250-300 g), maintained on a 12 h light/dark cycle, with free access to water and food were used. All experimental protocols

(including statistical evaluation) were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. Animal utilization reported in this study has been conducted in accordance in accordance with national and international legislation (guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and of U.S. Public Health Services Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals- PHS Policy) and with approval of Ethics Committee for animal research of the Federal University of Santa Maria (process number 114/2010). All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except TBA, which was obtained from Merk (Darmstadt, Germany); solutions were prepared in type I ultra pure water. Pentylenetetrazol (PTZ) was prepared in sterile 0,9% saline.

Study design

The study design is summarized in figure 1 and consisted of two experiments. The experiments were as follows.

In the experiment 1, in order to determine the role of creatine on TBI-induced oxidative damage (characterized by TBARS, total protein carbonyl content and Na^+, K^+ -ATPase activity) the injured and sham animals received intragastric gavage of either creatine (300 mg/kg body weight) suspended in 0,5% carboxymethylcellulose (CMC), or vehicle (CMC), 30 min after TBI and, once a day until third day after TBI. Another subset of animals received, also once a day, creatine (300 mg/kg body weight) or vehicle (CMC) until seventh day after TBI. Twenty-four hours after the last administration of creatine the animals were killed by decapitation and their brain was exposed by removing the parietal bone. The brains were quickly removed and the injured hemisphere

corresponding to the impact site of injury was rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri. After tissue sample was homogenized in cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and then divided in aliquots for subsequent neurochemical analyses.

In the experiment 2, we investigate the role of creatine in the process of post-traumatic epileptogenesis after Fluid Percussion Brain Injury (FPI). For this purpose, the injured and sham animals received intragastric gavage of creatine (300 mg/kg body weight) or vehicle (CMC) (Magni et al., 2007; Rambo et al., 2009). The administration of creatine once a day follows until third day after TBI. Another subset of animals received creatine (300 mg/kg body weight) or vehicle (CMC) during 7 days after TBI. Twenty- four hours after administration of creatine the sham and TBI animals received an injection of saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p) or subconvulsant dose of PTZ (35 mg/Kg, i.p.).

Fluid-percussion brain injury (FPI) and placement of electrodes for EEG recordings

TBI was induced by FPBI as originally described by D'Ambrosio *et al.* (2004). Animals were anesthetized with a single intraperitoneal (i.p.) injection, 3 ml/kg of Equitesin (1% Phenobarbital, 2% magnesium sulfates, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol). Under stereotaxic guidance, a craniectomy 3 mm in diameter was drilled on the right convexity parietal cortex, 2 mm posterior to bregma and 3 mm lateral to the midline, taking care to keep the duramater intact. A plastic injury cap was placed over the craniotomy with dental acrylic cement and was filled with chloranfenicol. During the surgery for the placement of the plastic injury cap, all animals were implanted with

electrodes for the EEG recordings. Two screw electrodes were placed over the parietal cortex, one rostral to the craniectomy and the other contralateral to the craniectomy along with a ground lead positioned over the nasal sinus. All electrodes were connected to a multipin socket fixed to the skull with dental acrylic cement. After the animal was removed from stereotaxic device and returned its homecage After 24 hours, the animals were anesthetized with isoflurane, and had the injury cap attached to the fluid percussion device and placed in the heat pad maintained at $37\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. TBI was produced by a fluid-percussion device developed in our laboratory. A brief (10 - 15 ms) transient pressure fluid pulse (3.53 ± 0.17 atm) impact was applied against the exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (Fluid Control Automação Hidráulica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Gould Ltd., Essex, UK). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of the fluid percussion injury (FPI).

PTZ test, behavioral evaluation and EEG recordings

To determine whether seizures threshold was reduced after TBI and to detect any enhance seizure susceptibility after TBI, we used a single subconvulsant dose of 35 mg/kg (i.p.) of body weight of PTZ. At the day of the experiments, each animal was transferred to a Plexiglas cage (25x25x40 cm) and habituated for 20 min before EEG recording. The rat was then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage, and the EEG was recorded using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neurotec Ltd, Itajubá, MG, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass),

digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After baseline recording, PTZ (35 mg/kg, i.p.) were administered. The animals were observed for the appearance of clonic and generalized tonic-clonic convulsive episodes for 20 min according to Ferraro et al. (1999), who describes clonic convulsions as episodes characterized by typical partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Such clonic events typically last 1–2 s and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization. Generalized convulsive episodes were considered as generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation, respectively. During the 20-min observation period, the latencies for the first clonic and first generalized tonic-clonic convulsions were measured. EEG recordings were visually analyzed for seizure activity, which were defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s ≥ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s). Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded.

Neurochemical analyses

Measurement TBARS

TBARS content was estimated by method of Ohkawa et al. (1970). Briefly homogenates were diluted 1:2 (v/v) in type I ultrapure water and incubated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was made up to 2 ml with type I ultrapure water and heated at 95 °C for 90 min in a water bath using a glass ball as a 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 the protein carbonyl content

Total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), adapted for brain tissue (Oliveira et al., 2004). Briefly, homogenates to 759-800 µg /ml of protein in each sample and 1 ml aliquots were mixed with 0.2 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.2 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 0.6 ml of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.8 ml of heptane (99.5%), and 1.8 ml of ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 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 calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹, as described by Levine et al. (1990)

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurement

Na⁺,K⁺-ATPase activity was performed according to Wyse et al. (2000). 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 of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 350 µl. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 µl of trichloroacetic acid (TCA, 50%). Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. 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 (1925), and Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-sensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

Protein determination

Protein content was colorimetrically determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

Statistical analyses

Data from ex-vivo total carbonyl, TBARS and Na⁺,K⁺-ATPase activity determinations were analyzed by two-way ANOVA (analysis of variance). The first myoclonic jerk latency and generalized convulsion latency were analyzed by Scheirer-Ray-Hare test for two way ANOVA for non-parametrical data. A

probability of $p < 0.05$ was considered significant. All data are expressed as mean \pm S.E.M.

RESULTS

Figure 2 displays the effect of creatine supplementation on protein carbonylation (2A and 2B) and TBARS (2C and 2D) in the ipsilateral cortex 4 and 8 day after FPI. Statistical analysis revealed that FPI induced protein carbonylation (2A) and TBARS (2C) increase and that creatine supplementation protected against this increase 4 days after neural injury (significant treatment, creatine or vehicle, by pretreatment, TBI or sham, interaction: TBARS [F(1,24)=4.540; $P < 0.05$] and protein carbonylation [F(1,19)=4.527; $P < 0.05$]). The supplementation of creatine also was effective against FPI-induced protein carbonyl [F(1,21)=4.898; $P < 0.05$; Fig. 2B] and TBARS content [F(1,21)=4,933; $P < 0.05$; Fig. 2D] increase when analyzed 8 days after neural injury.

Considering that Na^+ , K^+ -ATPase is target for free radicals generation (Lima et al, 2008; Lima et al., 2009), and that a decrease in its activity involves a neuronal hyperexcitability, we decided evaluate the role of this enzyme in the toxicity induced by FPI. Statistical analysis revealed a significant decrease of Na^+ , K^+ -ATPase activity after 4 [F(1,20)=5.300; $P < 0.05$; Fig. 3A] and 8 days [F(1,18)=4.442; $P < 0.05$; Fig. 3B] neural injury and that creatine supplementation did not protect against this decrease.

Figure 4 and 5 display quantitative time course study for EEG recordings in the ipsilateral cortex from sham and TBI-injury rats when analyzed 4 (Fig. 4) and 8 days (Fig.5) after FPI respectively. Statistical analysis revealed that injection of subconvulsant dose of PTZ (35 mg/Kg, i.p.) 4 but not 8 days after FPI, decreased latency for first generalized tonic-clonic seizures ($H(1)=0,002$;

$P < 0.05$; Fig. 4A) and increased the time of spent generalized tonic-clonic seizures ($[F(1,30)=4,327$; $P < 0.05$; Fig. 4B) when compared with sham group. Representative EEG recordings also revealed that injection of PTZ (35 mg/kg) caused only minor behavioral and EEG alterations in sham group (Fig.4C and 4D). However, this subeffective dose caused the appearance of generalized tonic-clonic seizures characterized by multispikes plus slow waves and major seizure activity characterized by 2-3 Hz high-amplitude activity in TBI group (Fig. 4E-H). After the ictal discharge, postictal EEG suppression and slow waves were observed, correlating with behavioral catalepsy. Statistical analysis revealed that supplementation of creatine (300 mg/kg) after severe FPI, had no effect on the parameters convulsive induced by PTZ 4 days after neural injury (Fig. 4). In addition, EEG recordings showed that the supplementation of this guanidine compound does not alter wave patterns when compared with sham group 8 days after neural injury (Fig. 5A-E)

DISCUSSION

The sequelae of TBI, including early posttraumatic seizures, represent a social problem where the importance of brain trauma as a risk factor for the development of epilepsy is well established (Lowenstein, 2009). Nevertheless, clinical trials aiming the prevention of epilepsy following TBI have failed (Temkin, 2009) due to the multiple epileptogenic processes that are likely activated simultaneously or sequential by brain trauma (Garga and Lowenstein, 2006). Thus, significant resources are required to develop a better understanding of the pathophysiologic mechanism as targets for potential prophylactic therapies.

In this study, in order to determine the presence of hyperexcitability as an index of epileptogenicity, we performed the PTZ test in a model of severe TBI. PTZ test has been used to show lowered seizures threshold in many epileptogenic aetiologies (Loscher et al., 1991; Velisek, 2006). Moreover, the susceptibility to seizures induced by PTZ is a standard and widely used experimental model of clinical generalized seizure with construct validity (Loscher et al., 1991).

Our results showed that the injection of subeffective dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.) caused early posttraumatic seizures 4 but not 8 days after a severe FPI episode in rat parietal cortex. Furthermore, TBI induced Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition and increased the levels of oxidative stress markers (protein carbonylation and TBARS), 4 and 8 days after the neural injury. These experimental findings suggest that, at least in part, the oxidative stress and seizures induced by sub effective dose of PTZ (35 mg/kg; i.p) represent separate pathways in neurobehavioral disability in this model of TBI. Thus, other mechanism could be modulating the hiperexcitability after TBI; in fact, it has been shown in previous studies that the excitatory currents in layer V pyramidal cells of epileptogenic cortex that revealed the presence of enhanced excitatory inputs and hyperexcitable circuits 3 days after the insult (McKinney et al, 1997; Graber and Prince, 2004), which are mechanisms that occur in parallel with the oxidative damage. Moreover, it is plausible propose that the loss of selected targets of synaptic proteins as Na^+, K^+ -ATPase may be correlated with early neuronal excitability, a significant component of the secondary injury cascade that accompanies TBI. In concordance with this view, the observation available from *in vitro* slice studies have demonstrated that cortical and

hippocampal excitability are increased in a variety of TBI models (Coulter et al., 1996; Tran et al., 2006).

The results presented in this report also showed that creatine supplementation (300 mg/kg) protected against FPI-induced protein carbonylation and TBARS increase 4 and 8 days after the neural. However, the supplementation of creatine did not protect against Na^+, K^+ -ATPase inhibition and seizures induced by sub effective dose of PTZ suggesting that antioxidant effect exerted by this guanidine compound does not protect against excitatory inputs generation in this model of TBI. In line of this view, clinical and experimental findings have demonstrated that creatine affords significant neuroprotection against experimental brain injury (Gasparovic et al., 2001; Sakellaris et al., 2006).

The mechanical basis for the neuroprotective effects of creatine compound involves alterations of the insult-induced depletions of cellular ATP. It has been demonstrated that chronic ingestion of Creatine results in increased brain levels of phosphocreatine (PCr) (Klivenyi et al., 1999). This maintenance of cellular ATP induced by creatine supplementation before TBI ameliorated the extent of cortical damage by such as 36% in mice and 50% in rats (Sullivan et al., 2000). Furthermore, lactate and free fatty acids, which are markers of secondary cellular injury following TBI, have been found to be lower in animals treated with Creatine before TBI (Scheff and Dhillon, 2004).

In the present study, the effective protection exerted by creatine supplementation after neural injury agree with assumption that the neuroprotective effect exerted by creatine in several neurodegenerative processes involves buffering of intracellular energy, preventing the increase of

Ca^{2+} and reactive oxygen species (ROS) intramitochondrial levels, which lead to excitotoxic and cell death (O’Gorman et al., 1997; Dolder et al., 2003; Andres et al., 2008). In studies using cultured mammalian cells exposed to various oxidizing agents, exogenously added creatine exerts direct antioxidant activity (Sestili et al., 2005). Thus, it is possible propose that stabilization of buffering of intracellular energy and antioxidant properties may underlie its recurrent protection evidenced in this model of TBI. In fact, increased levels of markers of oxidative stress have been found in human cerebrospinal fluid after TBI (Varma et al., 2003) as well as in controlled cortical impact models of TBI (Opii et al, 2007). Moreover, studies about memory from our group have showed that acute FPI induced an increase oxidative stress markers and decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity, suggesting that ROS-induced Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition may contribute to the deficits in spatial learning after TBI (Lima et al., 2008).

Nevertheless, this report also revealed that creatine supplementation, at doses capable of preventing FPI-induced free radicals generation, does not prevent FPI-induced seizures and Na^+ , K^+ -ATPase activity decrease, suggesting that protein carbonylation and lipoperoxidation may occur separately from convulsive episodes and that the ability of creatine to reduce this oxidative damage is not related to its anticonvulsant action. However, one must also consider that selected targets, such Na^+ , K^+ -ATPase, which could not contribute significantly to the total protein carbonyl and TBARS content, could be responsible for the FPI-induced convulsions 4 days after neural injury. Furthermore, it is important to consider that the Na^+ , K^+ -ATPase activity might be modulate by other mechanisms such as proshorylation. In this context, studies

on the functional effects of PKA/PKC-mediated phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase have demonstrated that activation of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) decreases Na⁺,K⁺-ATPase (Cheng et al. 1999; Nishi et al., 1999) In addition, the phosphorylation of the α-subunit at Ser-943 results in decreased enzyme activity by decreasing the cell surface availability of the enzyme (Bertorello et al. 2003). However, this discussion is speculative in nature, and further studies are necessary to elucidate this point.

In summary, the present study reports that a simple FPI episode in rat parietal cortex increases levels of oxidative stress markers (protein carbonylation and TBARS) and decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity, 4 and 8 days after the injury. The generalized tonic-clonic seizures induced by subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.) 4 but not 8 days after FPI suggest that , at least in part, the oxidative stress and early seizures represent separate pathways in neurobehavioral disability in this model of severe TBI. The results presented in this report also showed that creatine supplementation attenuated FPI-induced protein carbonylation and TBARS increase 4 and 8 days after neural injury. However, the supplementation of this guanidine compound did not protects against Na⁺,K⁺-ATPase decrease and have any effect on the parameters convulsive induced by subthreshold dose of PTZ suggesting that ability of creatine to reduce this oxidative damage is not related to its anticonvulsant action.

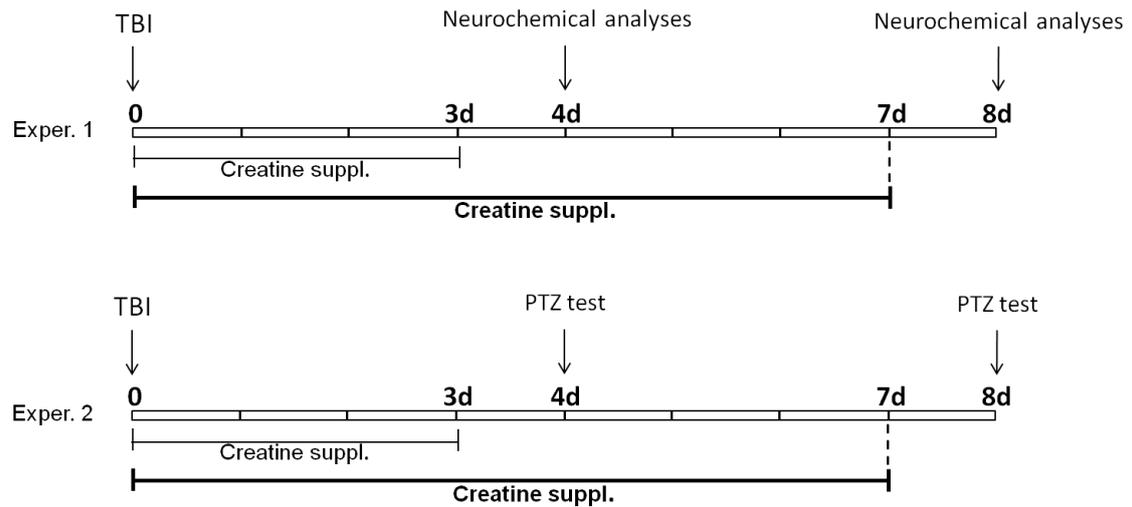


Figure 1. Study design. Rats receive intragastric gavage of creatine (300 mg/kg) or vehicle (CMC), 30 min after TB and once a day until third or seventh day after TBI. In the fourth and eighth day after were performed neurochemical analyses (experiment 1) or PTZ test (experiment 2).

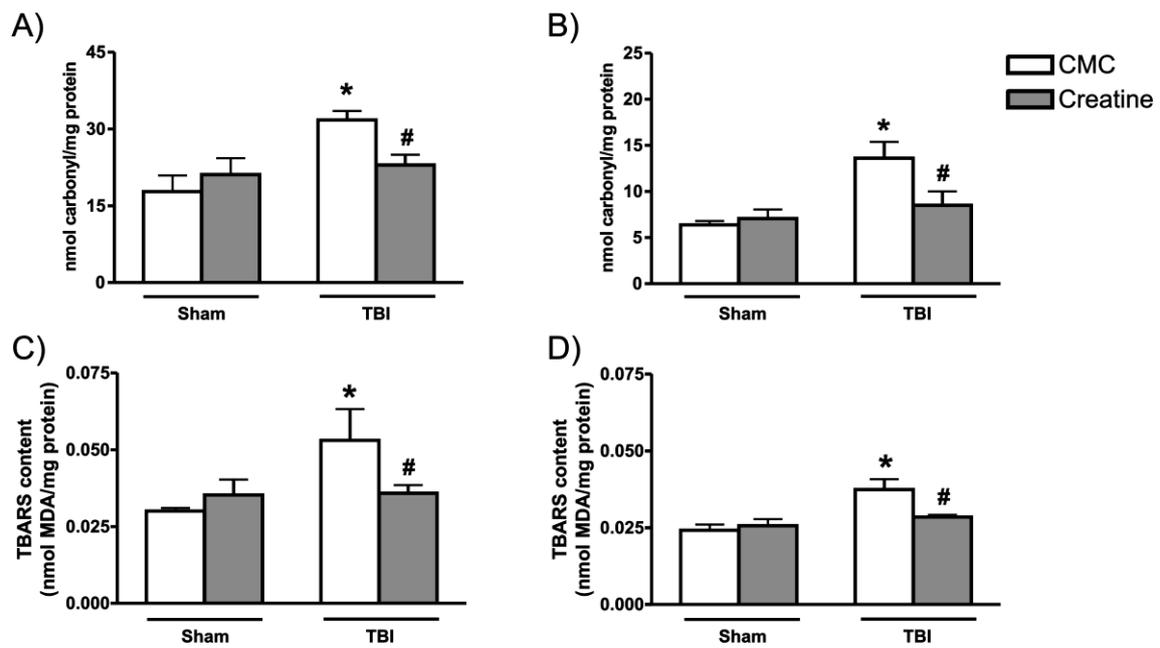


Figure 2. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg, p.o.) for (A and C) 3 days and (B and D) 7 days after TBI on the total protein carbonylation (A and B) and TBARS (C and D) levels. Data are mean+S.E.M. for any n= 8-10 in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with sham group. # Indicates a significant difference compared with TBI group.

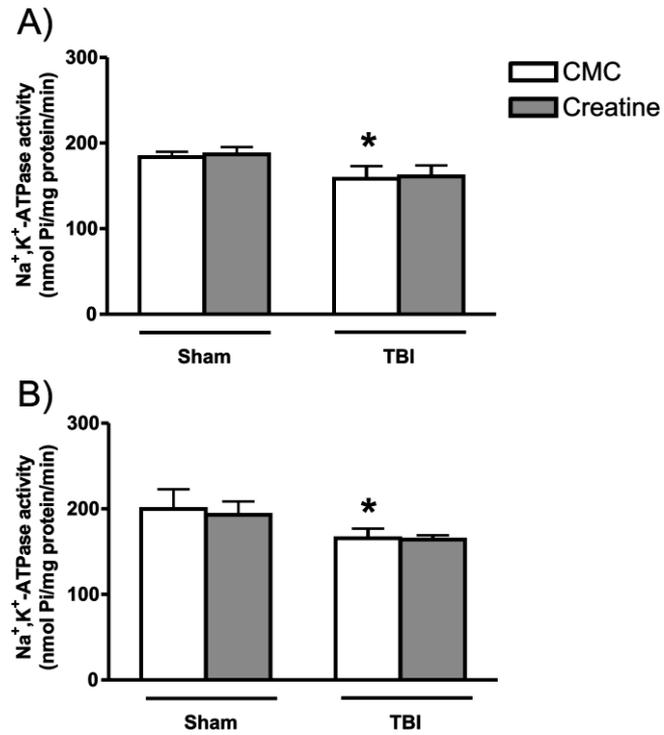


Figure 3. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg, p.o.) for (A) 3 days and (B) 7 days after TBI on Na⁺,K⁺-ATPase activity. Data are mean+S.E.M. for any n= 6-7 in each group. * Indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with control group.

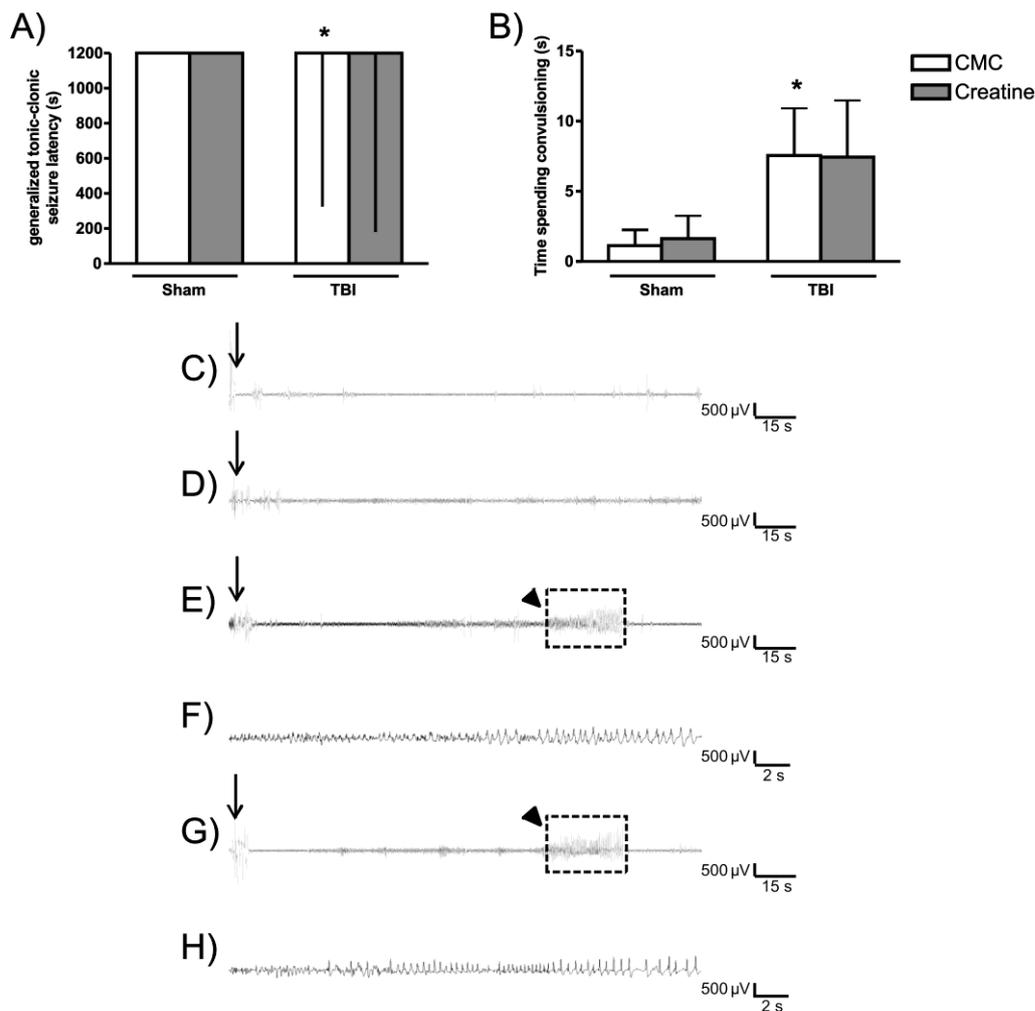


Figure 4. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg, p.o.) on the onset latency for generalized seizure (A) induced by sbconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.) and time spend in convulsing (B) 4 days after TBI. In figure A data are median and interquartile ranges for $n = 7-9$ in each group, while in figure B data are mean+S.E.M. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) from sham group. In this figure also is represented typical electrographics registers after administration of PTZ (35 mg/kg, i.p.) in Sham/CMC (C), Sham/Creatine (D), TBI/CMC (E) and TBI/Creatine (G) groups. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the arrowhead indicates the onset of EEG pattern associated with generalized seizure. The expanded waveforms from the EEG recording outline by the traced boxes are shown in (F) and (H) registers.

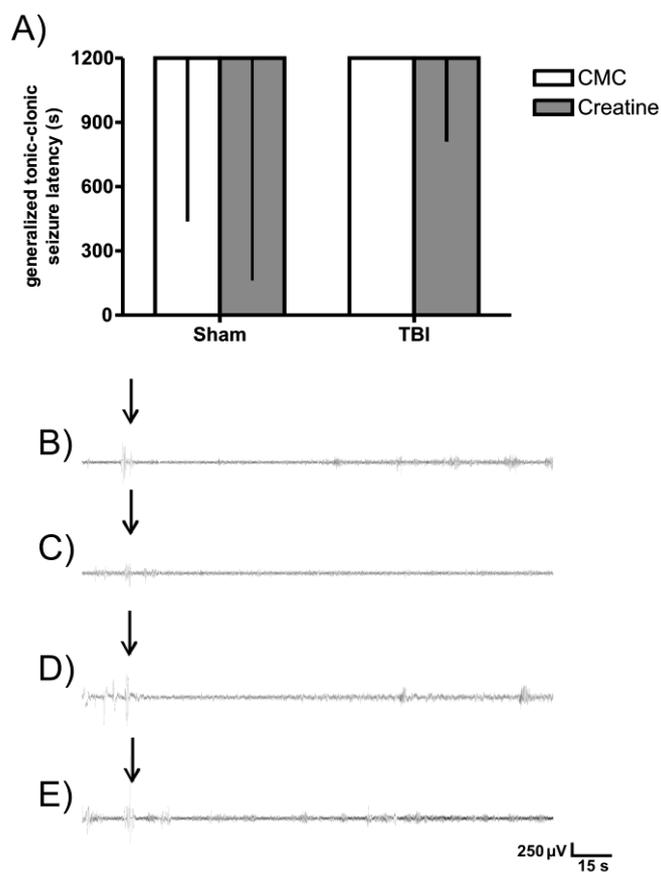


Figure 5. Effect of creatine supplementation (300 mg/kg, p.o.) on the onset latency for generalized seizure (A) induced by subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.). In figure A data are median and interquartile ranges for n= 7-9 in each group. There was not a significant difference from the respective parameter in vehicle-treated group. In this figure also is represented typical electrographics registers after administration of PTZ (35 mg/kg, i.p.) in Sham/CMC (B), Sham/Creatine (C), TBI/CMC (D) and TBI/Creatine (E) groups. In all traces the arrow indicates PTZ administration.

REFERENCES

Adhihetty, P.J.; Beal, M.F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromol Med* 10:275-290, 2008.

Andres, R. H., Ducray, A. D., Schlattner, U., Wallimann, T., & Widmer, H. R. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76, 329-343, 2008.

Bertorello, A.M.; Komarova, Y.; Smith, K.; Leibiger, I.B.; Efendiev, R.; Pedemonte, C.H.; Borisy, G.; Sznajder, J.I. Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase motion and incorporation into the plasma membrane in response to G protein-coupled receptor signals in living cells. *Mol Biol Cell* 14:1149-1157, 2003.

Bradford, M.M. 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, 1976.

Cheng, S.X. et al. [Ca²⁺]_i determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat Na⁺,K⁺-ATPase. *J Physiol* 518:37-46.

Coulter, D.A. et al. Brain injury-induced enhanced limbic epileptogenesis: anatomical and physiological parallels to an animal model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26:81-91, 1996.

Dolder, M.; Walzel, O.; Speer, U.; Schlattner, T.; Wallimann, T. Inhibition of the mitochondrial transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278:17760–17766, 2003.

Ferraro, T. et al. Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733-6739, 1999.

Fiske, C.H.; Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375-400, 1925.

Frey, L.C. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 44(suppl. 10):11-17, 2003.

Garga, N.; Lowenstein, D.H. Posttraumatic epilepsy: a major problem in desperate need of a major advances. *Epilepsy Curr* 6:1-5, 2006.

Gasparovic, C. et al. Decrease and recovery of N-acetylaspartate/creatine in rat brain remote from focal injury. *J Neurotrauma* 18:241-246, 2001.

Graber, K.D.; Prince, D.A. A critical period for prevention of neocortical post-traumatic epileptogenesis in rats. *Ann Neurol* 55:860–870, 2004.

Klivenyi, P. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5:347-350, 1999.

Levine, R.L., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1990.

Lima, F.D. et al. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase inhibition after traumatic brain injury. *Brain Research* 1279:147-155, 2009.

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* 193:306-310, 2008.

Loscher, W. et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy Res*, 8: 171–89, 1991.

Lowenstein, D.H. Traumatic brain injury: a glimpse of order among the chaos? *Ann Neurol* 66:A7-8,

McColl, C.D. et al. Electroencephalographic characterization of pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking the $\alpha 4$ subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234-243, 2003.

McKinney, R.A. et al. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nat Med* 3:990-996, 1997.

Morel, P. et al. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na^+/K^+ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 33:531-540, 1998.

Mujika, I.; Padilla, S. Creatine supplementation as an ergogenic acid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. *Int J Sports Med* 18:491-496, 1997.

Nishi, A. et al. Regulation of Na^+/K^+ -ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem* 73:1492-1501, 1999.

O'Gorman, E. et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414:253-257, 1997.

Ohkawa, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358, 1979.

Oliveira, M.S. et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728, 2004.

Opii W.O. et al. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24:772-779, 2007.

Pitkänen and McIntosh. Animal models of post-traumatic epilepsy. *J Neurotrauma* 26:241-261, 2006.

Pitkänen, A.; Lukasiuk, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Beh* 14:16-25, 2009.

Sakellaris, G. et al. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. *61:322-329*, 2006.

SCHEFF, S.W.; DHILLON, H.S. Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. *Neurochem Res* 29:469-479, 2004.

Sestili, P.; Martinelli, C.; Bravi, G. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40: 837-849, 2006.

Sullivan, P.G. et al. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol* 48:723-729, 2000.

Temkin, N.R. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 50:10-13, 2009.

Tran, L.D. et al. Response of the contralateral hippocampus to lateral fluid percussion brain injury. *J Neurotrauma* 23:1330-1342, 2006.

Varma, S. et al. F2-isoprostane and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *J Neurotrauma* 20:781-786, 2003.

Velisek, L. Models of chemically-induced acute seizures. In: Pitkanen, A.; Schwartzkoin, P.A.; Moshe, S.L.; editors. *Models of seizures and epilepsy*. London: Elsevier, Academic Press, pp. 127-52, 2006.

Wu, A.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exper Neurol*, 197:309-317, 2006.

Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M (2000) Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–2334.

Yan, L.J.; Traber, M.G.; Packer, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349-351, 1995.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O traumatismo crânioencefálico é o principal determinante de incapacidade e mortalidade em pessoas entre 1 a 44 anos (FREY, 2003). Devido à grande variedade de condições associadas ao TCE, há um considerável interesse na descoberta, e posterior aplicação, de marcadores bioquímicos que relacionem a gravidade do dano cerebral com o desenvolvimento de problemas neurológicos, como déficits de memória e desenvolvimento de epilepsia. O aperfeiçoamento nos cuidados iniciais ao paciente bem como dos centros de cuidados intensivos, tem proporcionado melhorias nas seqüelas induzidas pelo TCE. Mesmo assim, TCE é a principal causa de morte e de incapacidade nos países industrializados. Neste contexto, apesar de estar bem descrito na literatura que a produção excessiva de radicais livres e a diminuição, ou exaustão, do sistema antioxidante são eventos que podem levar a diversas alterações neurológicas após o TCE (ANSARI *et al.*, 2008), ainda são escassos na literatura estudos que relacionam, de uma forma direta e objetiva, o envolvimento da enzima Na^+, K^+ -ATPase bem como da produção de radicais livres no desenvolvimento de epilepsia após trauma. Da mesma forma, apesar das várias triagens clínicas de compostos com algum efeito farmacológico possuírem resultados pré-clínicos promissores, ainda não há nenhuma terapia com medicamento que mostre ser efetiva na redução do dano neuronal após TCE.

O presente estudo revelou que o dano oxidativo induzido pelo TCE grave foi caracterizado pelo aumento no conteúdo de proteína carbonil, geração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 4 e 8 dias após a injúria. Estes achados experimentais corroboram com o dano a membranas pelos radicais livres que ocorre comumente em pacientes com TCE (ZINK, 2001). Além disso, também nos mesmos períodos, TCE provocou uma redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase. A análise eletroencefalografica (EEG) revelou que a injeção de uma dose subconvulsivante de PTZ (35 mg /kg, intraperitoneal) 4, mas não 8 dias após o TCE, diminui a latência e aumentou a duração das convulsões generalizadas tônico-clônicas, quando comparado com o grupo controle. Também demonstramos que a suplementação com creatina (300 mg/kg) após o TCE reduz os níveis de TBARS e proteína carbonil quando

analisado 4 e 8 dias após a injúria. Já a suplementação deste composto não protegeu da inibição da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, 4 e 8 dias após a TCE. Creatina também não exerceu qualquer efeito sobre as alterações nos parâmetros convulsivos induzidas pela injeção de uma dose subconvulsivante de PTZ (35 mg /kg) após TCE.

Embora ainda não se tenha o exato entendimento sobre os mecanismos secundários envolvidos na fisiopatologia do TCE, os resultados apresentados neste estudo representam uma nova visão acerca da participação dos radicais livres no desenvolvimento de convulsões após o trauma. Salientamos que, em nossas condições experimentais, o dano oxidativo não está envolvido diretamente na suscetibilidade aguda a convulsões após injúria neuronal, na medida em que o aumento na produção de TBARS e carbonilação protéica, 4 e 8 dias após TCE, não se relacionou com a suscetibilidade ao aparecimento de convulsões induzidas pela injeção de uma dose subconvulsivante de PTZ (35 mg / Kg). De fato, registros eletroencefalográficos demonstraram que a injeção PTZ (35 mg / Kg) induziu convulsões 4, mas não 8 dias após o TCE. Uma possível explicação para este fato poderia ser a reorganização sináptica que ocorre após TCE, e também em outros modelos de epilepsia (PITKÄNEN & LUKASIUK, 2009; SUTULA *et al.*, 1998). Esta reorganização parece ser um evento independente do dano oxidativo. De fato, tem sido demonstrado que após o período latente, neurônios piramidais da camada V tem extensa arborização axonal, ocorrendo um aumento no número de feixes e na densidade de botões sinápticos. Além disso, o crescimento axonal e a hiperexcitabilidade também ocorrem em outros modelos de traumatismo (McKINNEY *et al.*, 1997) e no dano neuronal causado pelo estado epiléptico (SUTULA *et al.*, 1998). Dados eletrofisiológicos, incluindo medidas de correntes nas células piramidais da camada V e registros de potenciais de campo, confirmam a presença de circuitos eferentes hiperexcitáveis (LI & PRINCE, 2002). De acordo com dados da literatura, estas mudanças na conectividade sináptica já são detectadas 3 dias após a lesão (McKINNEY *et al.*, 1997; GRABER & PRINCE, 1999), embora este período varie de acordo com o modelo animal.

No que se refere a especificidade dos mecanismos envolvidos nesta toxicidade, o presente estudo também evidenciou uma significativa diminuição

na atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, uma enzima sensível ao ataque dos radicais livres (MOREL *et al.*, 1995). Na medida em que a enzima Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana, a mesma se torna um alvo fácil ao ataque dos radicais livres na membrana lipídica, principalmente no cérebro, uma estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais são altamente suscetíveis à lipoperoxidação. PIERRE *et al.* (1999), mostraram que mudanças na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase são acompanhadas por aumento nos níveis de MDA, um produto final da lipoperoxidação. De forma semelhante LEES (1991), sugere que alterações na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase podem estar relacionadas a alterações na membrana celular induzidas por lipoperoxidação, via radicais livres produzidos durante a isquemia.

Por outro lado, resultados do presente estudo revelaram que 8 dias após o TCE, a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase permaneceu reduzida e não foi observado alteração na suscetibilidade as convulsões induzidas por PTZ. Este dado pode ser um indicativo que a presente enzima pode não estar diretamente envolvida na suscetibilidade aguda a convulsões após TCE e, que outro mecanismo estaria modulando estas mudanças, como o modelo de crescimento e remodelamento axonal descrito anteriormente. Entretanto adicionais estudos são necessários para melhor definir o papel da Na⁺,K⁺-ATPase nas convulsões pós TCE.

Os efeitos antioxidantes exercidos pela creatina podem ocorrer de diferentes maneiras, como por exemplo, a manutenção da homeostase mitocondrial. Dentre os diversos fatores envolvidos na fisiopatologia após TCE, destaca-se o aumento na liberação de aminoácidos excitatórios que pode levar a morte neuronal devido à estimulação excessiva de seus receptores com o conseqüente aumento na concentração Ca²⁺ intracelular e geração de radicais livres (MATSUMOTO *et al.*, 1999). Sob estas condições, na tentativa de manter a homeostase celular, a mitocôndria é a principal organela responsável pela captação do excesso de Ca²⁺. Porém, a mitocôndria possui capacidade limitada de reter Ca²⁺ sendo que, altas concentrações intramitocondriais deste íon, levam à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPT), causando o desacoplamento da fosforilação oxidativa, inchaço mitocondrial, ruptura da membrana mitocondrial, além da produção de radicais livres (MATSUMOTO *et al.*, 1999). Dentre os diversos fatores que influenciam na

abertura do PPT destaca-se a enzima creatina quinase (CKm) mitocondrial, uma enzima que na forma octamérica é capaz de suprimir a abertura do PPT. Considerando que a suplementação de creatina estabiliza a forma octamérica da CKm e previne a abertura do PPT (AKSENOV *et al.*, 2000), é plausível propor que uma manutenção forma octamérica desta enzima pela creatina proteja contra a PPT conseqüente produção de radicais livres neste modelo de TCE grave.

Outro mecanismo de proteção exercido pela creatina poderia ser a manutenção dos níveis celulares de ATP. Neste contexto, tem sido demonstrado que uma queda nos níveis celulares de ATP leva a um acúmulo intracelular de Ca^{2+} , formação de radicais livres e dano oxidativo aos tecidos (PERSKY & BRAZEAU, 2001). Considerando que os mecanismos subjacentes a neuroproteção induzida por Cr em doenças neurológicas está relacionada com a manutenção dos estoques de fosfocreatina celular, integridade mitocondrial e conseqüente redução da produção de espécies reativas, é presumível propor que a suplementação deste composto aumente a capacidade de resistência, por parte dos neurônios, à depleção energética causada pelo TCE (PERSKY & BRAZEAU, 2001). Nesta mesma linha de raciocínio, estudos em cultura de células de mamíferos expostos a vários agentes oxidantes têm evidenciado que creatina, em concentrações comparáveis aquelas encontradas sob suplementação oral, exerce atividade antioxidante direta (SESTILI *et al.*, 2005).

No presente estudo, embora creatina tenha diminuído os níveis de carbonilação protéica e TBARS, 4 e 8 dias após TCE, isto não foi suficiente para prevenir a inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase, sugerindo que, nestes períodos, as espécies reativas não estariam modulando a atividade da enzima. Desta forma, em nossas condições experimentais, é importante considerar que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase poderia estar sendo modulada por outros mecanismos, como por fosforilação. Realmente, foi descrito que a fosforilação do resíduo de Ser-943 na subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase pode resultar na diminuição da atividade da enzima (BERTORELLO *et al.*, 2003). Além disso, é plausível propor que a falta de efeito anticonvulsivante exercida pela creatina não se deva a sua capacidade antioxidante, uma vez que a suplementação deste composto não protegeu das crises convulsivas após um TCE grave.

Contudo esta discussão é de natureza especulativa e estudos adicionais devem ser realizados para elucidar estas questões.

Em resumo, os resultados apresentado no presente estudo demonstraram que a suplementação com creatina por 3 e 7 dias consecutivos após TCE grave protegeu contra o dano oxidativo, representado pelos níveis totais de proteína carbonil e TBARS. Contudo, no mesmo período, creatina não demonstrou qualquer efeito sobre a suscetibilidade as convulsões induzidas por dose subconvulsivante de PTZ. Além disso, considerando que a suplementação deste composto não protegeu da inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase é plausível propor que estresse oxidativo e suscetibilidade a convulsões são eventos independentes e, sugere-se, que a efetiva proteção exercida pela suplementação de creatina no dano neuronal induzido pelo TCE não se deva a proteção de alvos específicos como a enzima Na^+, K^+ -ATPase.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir:

a) A suplementação oral com creatina por 3 dias consecutivos após TCE diminui os níveis de carbonilação protéica e peroxidação lipídica (representada pelos níveis de TBARS), e não protege da redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase; a suplementação por 7 dias consecutivos não demonstrou nenhum efeito sobre os parâmetros avaliados;

b) Em 3 dias após TCE, os animais que sofreram TCE são suscetíveis as convulsões induzidas por dose subconvulsivante de PTZ e, creatina não protege contra esta suscetibilidade. Em 7 dias após TCE não há nenhuma suscetibilidade as convulsões induzidas pela mesma dose de PTZ;

c) Em nossas condições experimentais, o dano oxidativo não está diretamente associado à suscetibilidade a convulsões após TCE, sendo que outros mecanismos parecem estar modulando o aparecimento dos episódios convulsivos agudos provocados pela lesão traumática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIHETTY, P.J.; BEAL, M.F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. **Neuromol Med** 10:275-290, 2008.

AKSENOV, M. et al. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **J Neurochem** 74:2520-2527, 2000.

ALBENSI, B.C. *et al.* Cyclosporin ameliorates traumatic brain-injury-induced alterations of hippocampal synaptic plasticity. **Exp Neurology** 162:385-389, 2000.

ANDRES, R.H., *et al.* Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull** 76:329-343, 2008.

ANSARI, M.A.; ROBERTS, K.N.; SCHEFF, S.W. A time course of contusion-induced oxidative stress and synaptic proteins in cortex in a rat model of TBI. **J Neurotrauma** 25:513-526, 2008.

ARUNDINE, M. *et al.* Vulnerability of central neurons to secondary insults after in vitro mechanical stretch. **J Neurosci** 24:8106-8123, 2004.

BASHKATOVA, V. et al. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain increased during pentylenetetrazole-induced seizures. **J Mol Neurosci** 14:183-190, 2000.

BERTORELLO, A.M. et al. Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase motion and incorporation into the plasma membrane in response to G protein-coupled receptor signals in living cells. **Mol Biol Cell** 14:1149-1157, 2003.

BERTORELLO, A.M. et al. Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase motion and incorporation into the plasma membrane in response to G protein-coupled receptor signals in living cells. **Mol Biol Cell** 14:1149-1157, 2003

BLUMBERGS, P.C. et al. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. **J Neurotrauma** 12:565-622, 1995.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. **Death and Diff** 3:71-78, 1996.

ENGLANDER, J.E. et al. Analyzing risk factors for late posttraumatic seizures: a prospective, multicenter investigation. **Arch Phys Med Rehabil** 84:365-373, 2003.

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

GENNARELLI, T.A. The spectrum of traumatic axonal injury. **Neuropathol Appl Neurobiol** 22:680-686, 1996.

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

GRABER, K.D.; PRINCE, D.A. Tetrodotoxin prevents posttraumatic epileptogenesis in rats. **Ann Neurol** 46:234-242, 1999.

GRAHAM, D.I. et al. The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. **Brain Pathol** 5:397:406, 1995.

GREVE, M.W.; ZINK, B.Z. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Mt Sinai J Med** 76:97-104, 2009.

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

- HALTINER, A.M.; TEMKIN, N.R.; DIKMEN, S.S. Risk of seizure recurrence after the first late posttraumatic seizure. **Arch Phys Med Rehabil** 78:835-840, 1997.
- HAUSMANN E.H. *et al.* Selective chemokine mRNA expression following brain injury. **Brain Res** 788:49-59, 1998.
- HAYES, R.L.; DIXON, C.E. Neurochemical changes in mild head injury. **Semin Neurol** 14:25-31, 1994.
- HERMAN, S.T. Epilepsy after brain insult. **Neurology** 59:21-26, 2002.
- IN'T ZANDT, H.J. *et al.* Cerebral creatine kinase deficiency influences metabolite levels and morphology in the mouse brain: a quantitative in vivo ¹H and ³¹P magnetic resonance study. **J Neurochem** 90:1321-1330, 2004.
- IPSIROGLU, O.S. *et al.* Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. **Life Sci** 69:1805-1815, 2001.
- JAGER, T.E. *et al.* Traumatic brain injuries evaluated in U.S. emergency departments, 1992-1994. **Acad Emerg Med** 7:134-140, 2000.
- JOST, C.R. *et al.* Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **Eur J Neurosci** 15:1692-1706, 2002.
- JUHN, M.S.; TARNOPOLSKY, M. Oral creatine supplementation and athletic performance: A critical review. **Clin J Sport Med** 8:286-297, 1998.
- JULIET, P.A. *et al.* Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. **Brain Res** 1210:230-239, 2008.

KHARATISHVILI, I.; PITKÄNEN, A. Posttraumatic epilepsy. **Curr Opin Neurol** 23:183-188, 2010.

KIM, J.S.; He, L.; Lemasters, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun** 304:463-470, 2003.

KOCHANEK, O.M. Berger biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. **Curr Opin Crit Care** 14:135-141, 2008.

LEES, G.J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res Brain Res Rev** 16:283-300, 1991.

LEONARD, J.R. *et al.* Fluid percussion injury causes loss of forebrain choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor immunoreactive cells in the rat. **J Neurotrauma** 11, 379-392, 1994.

LI, H.; PRINCE, D.A. Synaptic activity in chronically injured, epileptogenic sensory-motor neocortex. **J Neurophysiol** 88:2-12, 2002.

LOPINA, O.D. Interaction of Na,K-ATPase Catalytic Subunit with Cellular Proteins and Other Endogenous Regulators. **Bioch (Moscow)** 10:1122-1131, 2001.

MacGREGOR, D.G. *et al.* Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. **Brain Research** 727:133-144, 1996.

MATSUMOTO, S. *et al.* Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. **J Cereb Blood Flow Metab** 19:736-741, 1999.

- McKINNEY, R.A. et al. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. **Nat Med** 3:990-996, 1997.
- MEYER, L.E. et al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: Antioxidant role of mitochondrial kinases-dependent ADP re-cycling activity. **J Biol Chem** 281:37361-37371, 2006.
- MILATOVIC, D. et al. Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. **Brain Res** 912:67-78, 2001.
- MOREL, P. et al. Effects of 4- hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. **Neurochem Int** 33:531-540, 1998.
- MORI, A. Reactive oxygen species and mechanism of induction of seizures by guanidino compounds. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (eds) Free radicals in brain physiology and disorders. **Academic Press, San Diego**, pp 3-15, 1996.
- MUJIKA, I; PADILLA, S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly athletes: a critical review. **Int J Sports Med** 18:491-496, 1997.
- MURASHIMA, Y.L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Role of nitric oxide in the epileptogenesis of EI mice. **Epilepsia** 41:195-199, 2000.
- NORTJE, J.; MENON, D.K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Curr Opin Neurol** 17:711-718, 2004.
- O'GORMAN, E. et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett** 414:253-257, 1997.

- OKONKWO, D.O.; POVLISHOCK, J.T. An intrathecal bolus of Cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab** 19:443-451, 1999.
- OYESIKU, N.M. *et al.* Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. **Brain Res** 833:161-172, 1999.
- PATEL, M. Superoxide involvement in excitotoxicity: a SODmimetic holds promise as a novel neuroprotective agent. **Mol Psychiatry** 1:362-363, 1996.
- PAYAN, H.; TOGA, M.; BERARD-BADIER, M. The pathology of posttraumatic epilepsies. **Epilepsia** 11:80-94, 1970.
- PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacol Rev** 53:161-176; 2001.
- PIERRE, S. *et al.* Ginkgo biloba extract (EGb761) protects Na,K-ATPase isoforms in nonfailing and failing myocardium. **Neuroreport** 10:47-51, 1999.
- PINEDA, J.A. *et al.* Clinical significance of alpha II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. **J Neurotrauma** 24:354-366, 2007.
- PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy & Behavior** 14:16-25, 2009.
- PITKÄNEN, A.; McINTOSH, T.K. Animal model of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma** 23-241-261, 2006.
- PRASS, K. *et al.* Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in amouse model of stroke. **J Cereb Blood Flow Metab** 27:452-459, 2007.

- RAY, S.K.; DIXON, C.E.; BANIK, N.L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. **Histol Histopathol** 17:1137-1152, 2002.
- REBAUDO, R. *et al.* Increase of cerebral phosphocreatine in normal rats after intracerebroventricular administration of creatine. **Neurochem Res** 25:1493-1495, 2000.
- ROCK, K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev Pathol** 3:99-126, 2008.
- SAELENS, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene** 23:2861-2874, 2004.
- SAKELLARIS, G. *et al.* Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **J Trauma** 61:322-329, 2006.
- SCHEFF, S.W.; DHILLON, H.S. Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. **Neurochem Res** 29:469-479, 2004.
- SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; BRAVI, G. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radic Biol Med** 40: 837-849, 2006.
- SHERIFF, F.E.; BRIDGES, L.R.; SIVALOGANATHAN, S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for β -amyloid precursor protein. **Acta Neuropathol** 87:55-62, 1994.
- SHULMAN, R.G. *et al.* Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends Neurosci** 27:489-495, 2004.

- SILVER, J.M.; McALLISTER, T.W.; YUDOFKY, S.D. Test Book of Traumatic Brain Injury. 1 ed. Washington DC, **London, England: APPI Press**, 2005.
- SINSON G. *et al.* Improvement of cognitive deficits and decreased cholinergic neuronal cell loss and apoptotic cell death following neurotrophin infusion after experimental traumatic brain injury. **J Neurosurg** 86:511-518, 1997.
- SLEVEN, H. *et al.* Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. **Neurochem Int** 48:75-82, 2006.
- STAHL, W.L.; HARRIS, W.E. Na⁺, K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol** 44:681-693, 1986.
- STONE, J.R.; SINGLETON, R.H.; POVLISHOCK, J.T. Antibodies to the C-terminus of the β -amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. **Brain Res** 871:288-302, 2000.
- SULLIVAN, P.G. *et al.* Dietary Supplement Creatine Protects Against Traumatic Brain Injury. **Ann Neurol** 48:723-729, 2000.
- SULLIVAN, P.G. *et al.* Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? **J Neurosci Res** 79:231-239, 2005.
- SUTULA, T. *et al.* Synaptic and axonal remodeling of mossy fibers in the hilus and supragranular region of the dentate gyrus in kainate-treated rats. **J Comp Neurol** 390:578-594, 1998.
- TARNOPOLSKY, M.A.; BEAL, M.F. Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. **Ann Neurol** 49:561-574, 2001.
- THOMPSON, H.J. *et al.* Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. **J Neurotrauma** 22:42-75, 2005.

VAN DER KNAAP, M.S. *et al.* Mental retardation and behavioral problems as presenting signs of a creatine synthesis defect. **Ann Neurol** 47:540-543, 2000.

VERWEIJ, B.H. *et al.* Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. **J Neurosurg** 93:815-820, 2000.

WALDBAUM, S.; LIANG, L.P.; PATEL, M. Persistent impairment of mitochondrial and tissue redox status during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. **J Neurochem** 115:1172-1182, 2010.

WEBER, J.T. Calcium homeostasis following traumatic neuronal injury. **Curr Neurovasc Res** 1:151-174, 2004.

WILLMORE, L.J. *et al.* Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex. **Science** 200:1501-1503, 1978.

WILLMORE, L.J. *et al.* Formation of superoxide radicals after FeCl₃ injection into rat isocortex. **Brain Res.** 277:393-396, 1983.

ZINC, B.J. Traumatic brain injury outcomes: concepts for emergency care. **Ann Emerg Med** 37:318-332, 2001.