

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

Gustavo Cassol

**CONCUSSÕES RECORRENTES IMEDIATAMENTE APÓS EXERCÍCIO FÍSICO
DE NATAÇÃO OCASIONAM NEUROINFLAMAÇÃO E DIMINUEM A COGNIÇÃO
DE RATOS JOVENS**

Santa Maria, RS
2018

Gustavo Cassol

**CONCUSSÕES RECORRENTES IMEDIATAMENTE APÓS EXERCÍCIO FÍSICO
DE NATAÇÃO OCASIONAM NEUROINFLAMAÇÃO E DIMINUEM A COGNIÇÃO
DE RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Educação Física, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Educação Física**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS
2018

Cassol, Gustavo
CONCUSSÕES RECORRENTES IMEDIATAMENTE APÓS EXERCÍCIO
FÍSICO DE NATAÇÃO OCASIONAM NEUROINFLAMAÇÃO E DIMINUEM A
COGNIÇÃO DE RATOS JOVENS / Gustavo Cassol.- 2018.
73 p.; 30 cm

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Educação Física e desportos, Programa de
Pós-Graduação em Educação Física, RS, 2018

1. Concussão recorrente 2. Exercício físico 3.
Adolescência 4. Neuroinflamação 5. Memória I. Freire
Royes, Luiz Fernando II. Título.

Gustavo Cassol

**CONCUSSÕES RECORRENTES IMEDIATAMENTE APÓS EXERCÍCIO FÍSICO
DE NATAÇÃO OCASIONAM NEUROINFLAMAÇÃO E DIMINUEM A COGNIÇÃO
DE RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Educação Física, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Educação Física**.

Aprovado em 06 de agosto de 2018:



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



Juliano Ferreira, Dr (UFSC)



Mauro Schneider Oliveira, Dr (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe, Lourdes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Lourdes. Pois, sem ela nada teria sido concretizado, por todo apoio, carinho, dedicação e sobre tudo positividade, um exemplo de mulher vencedora nessa vida, tenho orgulho em dizer ser seu filho. Palavras não cabem nas entrelinhas para expressar todo o meu sentimento.

Pilares sustentam construções, eu tenho os meus, mesmo todos os obstáculos que a vida propõe, agradeço muito a minha namorada Domenika, mesmo com seu rostinho delicado e falta de altura, tem personalidade e tomadas de decisões de uma mulher forte. Gratidão define todo o apoio que tive destas duas mulheres tão importante em minha vida, mulheres de valor. Como diria Clovis Barros, “Pra trás nem pra pegar impulso”, pois vocês duas sempre estiveram e estão me impulsionando, sem desistir de mim, principalmente em uma época – diga-se de passagem- de vacas magras, sem precisar regredir em nada, aguentando firme. Amo vocês!

Outrora, não poderia deixar de agradecer por todo conhecimento adquirido nestes cinco anos de BioEx. Ao nando, por permitir minha permanência neste laboratório e mergulhar junto comigo num mundo novo como é a concussão, por todo conhecimento que auxiliou em meu crescimento profissional e pessoal. No que se trata de BioEx, podemos dizer que somos uma família (e não é propaganda), pessoas que criamos laços de amizade, levando para toda a vida. Tudo começa na iniciação, agradecer aos ensinamentos do dito bagual de livramento, vulgo Rogério, entre tantas pessoas ‘das antigas’ que sempre estiveram dispostos a me auxiliar. Não posso deixar passar abatido toda a parceria que tive com a Viviane, amizade que começou ainda na minha iniciação, agradeço muito pela paciência comigo.

Ressalto que, chegar todos os dias no Lab e ver a galera sempre de boa, sorrindo, produzindo ciência (Mano, tu qué f##e com meu mestrado?! Hahaha) e afim de ajudar de boa vontade, pessoas admiráveis, meus ICs. Sendo assim, ao botchocões do lab, Willian, Rafael, Leandro e Godinho, fico imensamente feliz em ter contribuído com o crescimento pessoal e profissional de vocês, é gratificante ver a criticidade que todos vocês têm com tudo, apenas percebemos quando quem ensinamos cresceu, quando estes nos questionam. Não poderia deixar de agradecer em especial ao Godinho, cara ímpar, amigo de fé e parceiro pra tudo, outro amante da concussão, que siga assim! No meio da caminhada, levamos muitos amigos conosco, alguns surgem de repente e nos fazem ver que ainda podemos contar com as pessoas, agradeço de coração ao Marlon, por todo auxílio e ensinamentos em uma hora de aperto e necessidade, bem como pela positividade e carinho da Fe Rodrigues, a parceria e disponibilidade da Alinoww, pelo pulso firme do Fiorin e pelo carinho da Carol. Não deixarei escapar em branco, uma das pessoas que sempre nos fizeram felizes no laboratório, a Dona Idalina, um doce em pessoa (Tudo bom? Tuuudo!). Complementando, que o auxílio das meninas do labcris e do 21 foram fundamentais para uma época de dúvidas e incertezas, principalmente a Cissa.

Todos vocês foram parte fundamental do meu crescimento, é um capítulo de minha vida que não esquecerei, obrigado a todos pelo carinho!

*A felicidade só é verdadeira quando
compartilhada*

(Christopher McCandless)

RESUMO

CONCUSSÕES RECORRENTES IMEDIATAMENTE APÓS EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO OCASIONAM NEUROINFLAMAÇÃO E DIMINUEM A COGNIÇÃO DE RATOS JOVENS

AUTOR: Gustavo Cassol
ORIENTADOR: Luiz Fernando Freire Royes

A concussão é uma alteração na função cerebral, ocasionada pela aceleração e desaceleração repentina do encéfalo. Ela está intimamente ligada aos esportes de contato como futebol, NFL e rugby, ocorrendo frequentemente na adolescência. Pouco se sabe sobre os efeitos das concussões recorrentes em adolescentes, principalmente com a soma do estresse ocasionado pelo exercício físico. Desta forma, foram utilizados ratos jovens com 41 dias de vida, submetidos a um período de exercício físico de cinco semanas, onde a cada semana eram efetuadas duas concussões, no segundo e no quinto dia, imediatamente após a natação. Setenta e duas horas após a última concussão, nós conduzimos os testes comportamentais, tais como campo aberto, reconhecimento de objeto e Barnes maze. Vinte e quatro horas após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi retirado para posteriores análises bioquímicas para RT-PCR (mRNA NFkB, IL-1 β , TNF- α , casp3, nAChR α 7, Nfe2l2, BDNF, Ntrk2 e CREB1) e Western Blotting (Iba-1, GFAP, TNF- α , caspase-3, nAChR α 7, SOD2, mBDNF, TrkB e phospho-CREB). A análise estatística revelou que as concussões recorrentes induziram déficit cognitivo na memória de longa duração (LTM) nos animais exercício. As análises bioquímicas revelam que concussões recorrentes induzem aumento na expressão de genes inflamatórios e apoptóticos como mRNA NFkB, IL-1 β e caspase-3 nos ratos sedentários. Além disso, foi observado um aumento de TNF- α nos animais concussão exercício quando comparado com o concussão sedentário. Isto mostra que, o exercício físico não potencializou o dano ocasionado pela concussão no mRNA destas proteínas. O mRNA nAChR α 7 mostrou-se diminuído no grupo concussão sedentário em relação ao controle sedentário. A expressão do mRNA nAChR α 7 não foi potencializada no grupo concussão exercício. Nenhuma diferença estatística foi vista no mRNA Nfe2l2. Análise de proteínas anti-inflamatórias por Western blotting revelou que, foi observado uma diminuição nos níveis de nAChR α 7 no grupo sedentário concussão em relação ao controle sedentário. No entanto, quando avaliado os níveis da enzima antioxidante SOD2, apenas o grupo concussão exercício mostrou-se diminuído quando comparado ao controle exercício. Nossos dados revelam que concussões recorrentes não induzem aumento de GFAP. Contudo, o exercício físico potencializou o conteúdo de proteínas inflamatórias como Iba-1, TNF- α , bem como a proteína apoptótica caspase-3. Por outro lado, a concussão não altera a expressão genica de BDNF, mas o mBDNF diminui no sedentário concussão quando comparado com o controle exercício. Quanto a expressão do gene de TrkB, o mRNA de Ntrk2, ambos grupos concussão estavam aumentadas em relação ao controle sedentário, mas o efeito da concussão não diferiu no conteúdo de TrkB. Sendo assim, em ambos grupos concussão o mRNA de CREB1 demonstrou aumentado em relação ao controle sedentário, enquanto, a quantidade de phospho-CREB apenas é diminuída nos grupos concussão em relação ao controle exercício. Nossos dados mostram que a concussão somada com o exercício físico exibe um aumento de proteínas inflamatórias, diminuindo a quantidade de algumas proteínas relacionadas a memória e que apenas a concussão por si só não exerce dano comportamental.

Palavras-chave: Concussão. Inflamação. Memória. Jovens. Esportes de contato. Hipocampo.

ABSTRACT

RECURRENT CONCUSSION IMMEDIATELY AFTER SWIMMING PHYSICAL EXERCISE CAUSE NEUROINFLAMMATION AND DECREASE COGNITION OF JUVENILE RATS

AUTHOR: Gustavo Cassol
ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes

Concussion is a change in brain function, caused by acceleration and deceleration of the sudden brain. It is closely linked to football, NFL and rugby sports, often occurring in adolescence. Little is known about the effects of recurrent concussions in adolescents, especially with the sum of stress caused by physical exercise. In this way, young rats with 41 days old were submitted to a physical exercise period of five weeks, where two concussions were performed each week, on the second and fifth days, immediately after swimming. Seventy-two hours after the last concussion, we conducted the behavioral tests, such as open field, object recognition and barnes maze. Twenty-four hours after the last behavioral test, the animals were euthanized and the hippocampus was removed for further biochemical analyzes for RT-PCR (mRNA NFkB, IL-1 β , TNF- α , casp3, nAChR α 7, Nfe2l2, BDNF, Ntrk2 and CREB1) and Western Blotting assay (Iba-1, GFAP, TNF- α , caspase-3, nAChR α 7, SOD2, mBDNF, TrkB and phospho-CREB). Statistical analysis revealed that recurrent concussions induced cognitive impairment in long-term memory (LTM) in exercise animals. Biochemical analyzes reveal that recurrent concussions induce increased expression of inflammatory and apoptotic genes such as mRNA NFkB, IL-1 β and caspase-3 in sedentary rats. In addition, an increase in TNF- α was observed in the animals concussion exercise when compared to sedentary concussion. This shows that, physical exercise did not potentiate the damage caused by concussion in the mRNA of these proteins. The mRNA nAChR α 7 was shown to be decreased in the sedentary concussion group in relation to the sedentary control. The mRNA nAChR α 7 expression was not potentiated in the concussion exercise group. No statistical difference was seen in the mRNA Nfe2l2. Analysis of anti-inflammatory proteins by Western blotting revealed that, a decrease in nAChR α 7 levels in the sedentary concussion group was observed relative to the sedentary control. However, when we evaluated the levels of the antioxidant enzyme SOD2, only the concussion exercise group was shown to be decreased when compared to exercise control. Our data reveal that recurrent concussions do not induce GFAP increase. However, physical exercise potentiated the content of inflammatory proteins such as Iba-1, TNF- α , as well as the apoptotic caspase-3 protein. On the other hand, concussion does not alter the BDNF gene expression, but the mBDNF decreases in the sedentary concussion when compared to the exercise control. Regarding gene expression for TrkB, the Ntrk2 mRNA, both concussion groups were increased relative to the sedentary control, but the concussion effect did not differ in TrkB content. Thus, in both concussion groups the CREB1 mRNA was shown to be increased in relation to the sedentary control, whereas, the amount of phospho-CREB was only decreased in the concussion groups in relation to the exercise control. Our data show that concussion plus physical exercise exhibits an increase in inflammatory proteins, decreasing the amount of some memory-related proteins and that only concussion alone does not exert behavioral damage.

Keywords: Concussion. Inflammation. Memory. Juvenile. Contact Sports. Hippocampus

LISTA DE GRÁFICOS

Introdução

Figura 1 – Demonstrativo do efeito chicote ocasionado pela concussão.....	16
Figura 2 – Representativo do neurônio e suas células gliais.....	21
Figura 3– Desenho esquemático da Micróglia.....	22
Figura 4 – Esquema da ativação de Nrf-2 e NFkB via nAChR $\alpha 7$	23

Manuscript

Figure 1. Experimental design	35
Figure 2. Effect of physical exercise and concussion on exploratory behavior, and motor coordination. The spontaneous locomotor activity of rats in number of crossing (A), number of rearing (B)	41
Figure 3. Effect of physical exercise and concussion on localization, short-term and long-term memory. The training of OLT (A), the OLT test (B), the training of ORT-STM (C), the ORT-STM test (D), and the ORT-LTM test (E).....	42
Figure 4. Effect of physical exercise and concussion on spatial memory. The latency time to escape (A), and the number of error (B).....	43
Figure 5. Effect of physical exercise and concussion on inflammatory and apoptotic gene expression. The NFkB, the major of inflammatory cytokines (A), the IL-1 β , inflammatory cytokine (B), TNF- α also is inflammatory cytokine (C), and casp3 is an apoptotic gene (D).....	44
Figure 6. Effect of physical exercise and concussion on nAChR $\alpha 7$ and Nfe2l2 gene expression. The nAChR $\alpha 7$, the major of anti-inflammatory regulator (A), the Nfe2l2, antioxidant regulator (B).....	45
Figure 7. Effect of physical exercise and concussion on neuroplasticity. The BDNF (A), the Ntrk2 (B), and CREB1 (C).....	47
Figure 8. Effect of physical exercise and concussion on inflammatory and apoptotic proteins. The Iba-1 was made to assess microglial activation (A), the GFAP was made to assess astrocyte reactive (B), the TNF- α is an inflammatory cytokine (C), and caspase-3 is a apoptotic marker (D).....	48
Figure 9. Effect of physical exercise and concussion on anti-inflammatory nAChR $\alpha 7$ and SOD2. The nAChR $\alpha 7$ (A), the SOD2, a scavenger protein (B).....	48
Figure 10. Effect of physical exercise and concussion on neuroplasticity and proteins related with memory. The mature BDNF (A), the TrkB, receptor for BDNF (B), and phospho-CREB, protein related with memory consolidation (C).....	49

LISTA DE TABELA

Introdução

Tabela 1 – Escala de coma de Glasgow15

Manuscript

Table 1 – Sequences of the primers used for quantitative PCR amplifications.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento de Resposta antioxidante
BBB	Barrera Hematoencefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CDC	Center for Disease Control
CREB	Elemento de respostra ligado ao cAMP
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
ECG	Escala de Coma de Gasgow
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
ETC	Encefalopatia Traumática Crônica
EUA	Estados Unidos da América
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GSK-3	Glicogenio sintase Kinase-3
IL-1 β	Interleucina-1 beta
Jak2	Janus Kinase 2
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
mBDNF	BDNF maduro
nAChR $\alpha 7$	Receptor Nicotínico de Acetilcolina Alpha 7
NFkB	Fator Nuclear kappa B
NFL	Futebol Americano
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Traumatismo Cranioencefálico
TNF	Tumoral Necrose Factor alpha
TrkB	Tirosina quinase B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Traumatismo Cranioencefálico	14
2.2 Concussão	16
2.3 Memória	18
2.3.1 Tipos de Memória	18
2.3.2 Mecanismos relacionados a memória	19
2.4 Inflamação no Sistema Nervoso Central	20
2.4.1 O papel do $\alpha 7$ nachr sobre a inflamação no SNC	23
2.5 Exercício Físico	24
3 Objetivo	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 Artigo científico	28
4.1 Manuscrito	29
5 Discussão	56
6 Conclusão	61
7 Referências Bibliográficas	62

1 INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é classificado como uma alteração na função cerebral causada pela aplicação de uma força externa (MENON et al., 2010). Anualmente aproximadamente 60 milhões de pessoas são acometidas em todo o mundo (GARDNER, R. C. e YAFFE, 2015). O presente número pode ser ainda maior devido a subnotificação da população que não procura centros de tratamentos. No Brasil, estudos epidemiológicos revelam que a população mais atingida são homens, adultos jovens. (de Almeida, de Sousa Filho et al. 2016). O TCE é dividido em duas fases, o dano primário, caracterizado pelo momento do dano mecânico sobre a cabeça e o dano secundário, que são as consequências ocasionadas pelo dano primário. Quanto a gravidade, o TCE pode ser dividido em leve, moderado e grave (SAATMAN et al., 2008). Dentre os diversos tipos de TCE, a concussão cerebral, também conhecida como lesão cerebral traumática leve, é definida como um trauma (forte abalo) na cabeça, sem fratura óssea, que afeta temporariamente o funcionamento do cérebro, com repercussões físicas e emocionais (MCCRORY et al., 2013a). A maioria dos indivíduos se recupera completamente em algumas horas ou dias, sem necessitar de nenhum tipo de tratamento específico. Entretanto, as concussões cerebrais provocam pequenas lesões no cérebro e, por isso, caso aconteçam repetidamente ou caso sejam muito graves, podem provocar o desenvolvimento de sequelas como epilepsia ou perda de memória. Além disso, tem sido evidenciado que adolescentes que sofrem concussões recorrentes apresentam retardo no aprendizado e mudanças comportamentais como ansiedade e depressão (CASTILE et al., 2012; MINEN et al., 2016). A presente injúria neuronal tem sido associada com o desenvolvimento da Encefalopatia Traumática Crônica (CTE), facilitando o aparecimento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (OMALU et al., 2010).

Referente a concussões recorrentes, cabe ressaltar que existe uma janela de tempo que aumenta a vulnerabilidade do cérebro devido ao metabolismo energético prejudicado levando a déficits cognitivos mais significativos e recuperação prolongada. Por exemplo, dos estudantes do ensino médio que praticam esportes de contato, 13,2% são vítimas de concussão recorrente e apresentam sintomas comportamentais de longo prazo, como ansiedade e déficits cognitivos (CASTILE et al., 2012). Já atletas que voltam a jogar antes da resolução dos sintomas neurológicos causados pela injúria, são predispostos a um aumento na gravidade dos sintomas

provocados por essa lesão (LONGHI et al., 2005; LOVELL e COLLINS, 1998; SHREY et al., 2011). No Sistema Nervoso Central (SNC), as concussões recorrentes recrutam neutrófilos e monócitos que, em combinação com a micróglia e astrócitos secretam citocinas inflamatórias. O influxo de leucócitos para o sítio inflamatório é orquestrado por uma regulação positiva seqüencial de moléculas de adesão no endotélio vascular levando ao aparecimento de edema pós-traumático e ruptura da barreira hematoencefálica (BBB) (BASKAYA et al., 1997; UNTERBERG et al., 1997). Um aumento no conteúdo de água no tecido cerebral e disfunção da barreira hematoencefálica pode causar morte neuronal por processos envolvendo níveis aumentados de aminoácidos excitatórios e perda de equilíbrio iônico (LENZLINGER et al., 2004; SHLOSBERG et al., 2010). Cabe salientar que esses processos também alteram as moléculas de sinalização para organizar uma resposta imunológica evidenciada por sobreregulação de citocinas por um período mais longo (TRUETTNER, J. S. et al., 2018a).

Em modelos experimentais de concussões recorrentes, a resposta de citocinas é extremamente complexa. Por exemplo, enquanto os níveis de IL-1 α , mostram uma elevação e uma queda aguda após uma concussão, os níveis de IL-1 β tendem a permanecer elevados por um período mais longo, aumentando em uma quantidade relativa à gravidade do trauma. (HOLMIN, S. et al., 1997a). Entretanto, apesar da neuroinflamação crônica ter sido implicada na fisiopatologia da concussão, faz-se necessário um melhor entendimento de como a gravidade da lesão cerebral altera a sinalização inflamatória e como as citocinas podem alterar moléculas sinalizadoras envolvidas na memória. Além disso, há um interesse crescente em investigar o papel da inflamação na fisiopatologia induzida por concussões esportivas recorrentes, especialmente em relação ao transtorno pós-concussivo. Para esta proposta, decidimos investigar se a resposta inflamatória exacerba a fisiopatologia do trauma cerebral em um modelo de concussão recorrente-esportiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é classificado como uma alteração na função cerebral causada pela aplicação de uma força externa (MENON et al., 2010). Estudos epidemiológicos indicam que nos EUA aproximadamente 2.5 milhões de pessoas sofrem TCE anualmente (BARRIO et al., 2015; TAYLOR et al., 2017), de acordo com o CDC (Center for Disease Control) foram gastos em 2010 aproximadamente U\$76.5 bilhões com TCE (FAUL e CORONADO, 2015). Anualmente, mais de 57 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por este evento, com elevada prevalência de morte entre crianças e jovens adultos (BAKER et al., 2008; (GARDNER, A. et al., 2014). Na Austrália, a cada 20 atendimentos no departamento pediátrico, um é voltado para o tratamento do TCE, mostrando ser uma epidemia que abrange todas as faixas etárias (NOLAN e PENNY, 1992).

No Brasil, dados do DATASUS mostram que entre 2008 e 2012, houveram 125.500 internações em decorrência de TCE, correspondendo com uma taxa de mortalidade de cerca de 5.1 por 100 mil habitantes por ano, gerando gastos que se somam a R\$ 156.300.00, (DE ALMEIDA et al., 2016; FERNANDES e SILVA, 2013; MAGALHÃES et al., 2017). Sendo que, nos últimos 10 anos mais de um milhão de pessoas tornou-se inválidas em decorrência de traumas mecânicos (MELO et al., 2004). Corroborando com os dados acima, outros estudos mostram que a incidência de acometidos pelo evento chega a ser 3.5 vezes maior em homens, sendo estes os casos mais graves (DE ALMEIDA et al., 2016). Na cidade de Pelotas, no Rio Grande do Sul, a população com menos de 15 anos correspondeu a 44% da amostra lesionada (SANTOS et al., 2013). No estado do Ceará, no período de 2010 à 2011, 87% dos casos eram homens, dentre estes, 18,1% dos atendidos representavam a faixa etária do presente estudo, entre 10 e 20 anos de idade (ELOIA et al., 2011). Devido a subnotificação dos dados, por parte de critérios dos estudos ou até mesmo pela não procura de setores de pronto atendimento, podem sugerir que os índices são muito maiores (MAGALHÃES et al., 2017).

Em relação a lesão ocasionada pelo TCE, pode-se dividir em duas fases, o dano primário, momento em que há lesão no encéfalo por movimento de aceleração/desaceleração ou fratura óssea, sendo passível apenas por orientação e utilização de políticas públicas de prevenção contra os acidentes, e o dano

secundário, consequência do dano primário, englobando as cascatas neuroquímicas após o TCE, podendo ser vista em horas, dias e até mesmo anos após o evento. Quanto a classificação de gravidade do TCE, é comumente feita através de indicadores clínicos que avaliam o nível de consciência dos pacientes, um exemplo é a Escala de Coma de Glasgow (ECG), amplamente utilizada imediatamente após o incidente (TEASDALE e JENNETT, 1974). Embora existam tecnologias que auxiliam a classificar os diferentes tipos de enfermidades, a ECG como vantagem a rápida aplicabilidade, facilitando o diagnóstico hospitalar.

Abertura Ocular			
Critério	Verificado	Classificação	Pontuação
Olhos abertos previamente à estimulação	√	Espontânea	4
Abertura ocular após ordem em tom de voz normal ou em voz alta	√	Ao som	3
Abertura ocular após estimulação da extremidade dos dedos	√	A pressão	2
Ausência persistente de abertura ocular, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Olhos fechados devido a fator local	√	Não Testavel	NT

Resposta Verbal

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

Melhor resposta Motora

Critério	Verificado	Classificação	Pontuação
Cumprimento de ordens com 2 ações	√	A ordens	6
Elevação da mão acima do nível da clavícula ao estímulo na cabeça ou pescoço	√	Localizadora	5
Flexão rápida do membro superior ao nível do cotovelo, padrão predominante não anormal	√	Flexão normal	4

Flexão do membro superior ao nível do cotovelo, padrão predominante claramente anormal	√	Flexão anormal	3
Extensão do membro superior ao nível do cotovelo	√	Extensão	2
Ausência de movimentos dos membros superiores/inferiores, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Fator que limita resposta motora	√	Não testável	NT

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

O TCE é dividido em três categorias: grave, moderado e leve (SAATMAN et al., 2008). Até então, a concussão era classificada na categoria de TCE leve (TCEL), porém, sugere-se que ela tem identidade própria, e que não necessariamente, leve a perda da consciência e demonstre anormalidade no padrão estrutural de imagem, como as demais categorias, mas que pode resultar em uma cascata fisiopatológica complexa, principalmente na população mais jovem (GRAFF e CAPERELL, 2016; MCCRORY et al., 2013a).

2.2 CONCUSSÃO

Dentre os principais efeitos da concussão no encéfalo, está a aceleração e desaceleração ocasionada pelo impacto, que deve-se muitas vezes ao “efeito chicote” do pescoço em relação a um objeto, comum em acidentes automobilísticos e até em esportes de contato.

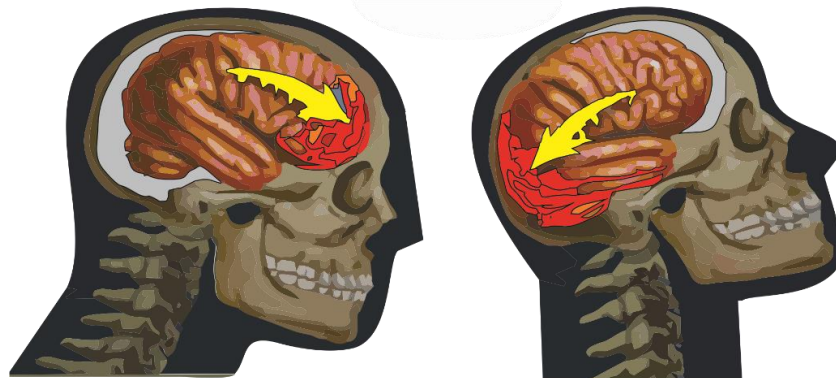


Figura 1. Efeito chicote ocasionado pela concussão (adaptado da internet)

Nesse sentido, há relatos clínicos dos efeitos comportamentais em decorrência de concussões recorrentes ao longo da vida, tais como ansiedade, irritabilidade, depressão e déficit cognitivo (MCCRORY et al., 2013a; TAGGE et al., 2018). Bem como, por influência de fatores genéticos e ambientais, como a concussão, facilitando o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas com a Doença de Alzheimer,

Doença de Parkinson e a mais comum em militares e atletas, a Encefalopatia Traumática Crônica (ETC) (OMALU et al., 2010). A somatória de concussões ao longo da vida pode mudar a neuroquímica do encéfalo, como a do hipocampo, principal estrutura cerebral responsável pela memória.

É válido ressaltar que há diferença nas características do cérebro de adultos e crianças, devido ao grau de mielinização diferenciado existente nas divergentes idades (SEMPLE et al., 2013; SEMPLE et al., 2016). Além disso, mudanças na mielinização ao longo do tempo estão subjacentes a um aumento progressivo da substância branca no cérebro em desenvolvimento (GIEDD et al., 1999; TASKER, 2006). Nesse sentido, a concussão ocasiona lesão axonal difusa, implicando em perturbações na membrana axonal, bem como a provável diminuição de mielina e atrofia da substância branca, podendo ser atribuída a lesão tardia. Em jovens e crianças, as lesões axonais difusas são normalmente atribuídas a esportes de contato, acometendo o cérebro durante uma fase de crescimento e mielinização em um período de desenvolvimento, levando a diminuição na organização neuronal (EWING-COBBS et al., 2008; MCCRORY et al., 2013a; TASKER, 2006)

Sabe-se que insultos cerebrais ocasionados por TCE e/ou concussão, são as causas mais comuns de morte ou retardo no desenvolvimento de habilidades na infância (DUHAIME et al., 2000; KILBAUGH et al., 2015). Sendo assim, em cérebros jovens, os neurônios e as células da glia podem estar mais vulneráveis a morte celular em certos períodos de maturação e de processos de diferenciação no encéfalo, quando expostos a um insulto externo (BITTIGAU et al., 1999), como exemplo a concussão. Devido a heterogeneidade destes eventos em crianças, torna-se difícil especificar o melhor tratamento para a particularidade de cada concussão ou TCE (LUERSSEN e KLAUBER, 1995).

A concussão, objeto de estudo do presente projeto, mostra grande incidência na população jovem, cerca de 32% do total dos casos de concussão ocorrem entre dez a dezenove anos de idade (ZHANG et al., 2016). Neste contexto, pacientes jovens acometidos pela concussão podem apresentar um prejuízo em seu desenvolvimento comportamental em geral (FIDAN et al., 2016; MEEHAN e MANNIX, 2010; SCHNEIDER et al., 2013; TAGGE et al., 2018). Principalmente quando há um aumento no número de crianças que iniciam esportes radicais sem as devidas

proteções, conhecidas por minimizarem os danos ocasionados pela concussão (CANDY et al., 2017).

Dentre as consequências da concussão, pode-se citar os prejuízos a longo prazo em habilidades cognitivas (déficit no funcionamento intelectual, atenção, memória, linguagem, habilidades visuais-espaciais e executivas) (MCCRORY et al., 2013a). Desta forma, o déficit cognitivo após a concussão é de extrema importância, visto que as alterações de memória podem estar presentes durante todo o desenvolver do quadro neurológico. Na fase inicial, após uma concussão, o paciente pode apresentar amnésia (CANTU, 1998; MCCRORY et al., 2013a). Na fase crônica, as preocupações são normalmente associadas com o aumento da distração, comprometendo a atenção, memória de trabalho e recuperação de informações, ou seja, dano cognitivo (FLYNN, 2010).

2.3 MEMÓRIA

Os efeitos mais visíveis de concussões recorrentes estão relacionados a cognição e principalmente, a piora da memória. Ela é resultado de um processo temporal gradativo, a qual por sua vez necessita que a informação seja armazenada e consolidada (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A cognição, é fundamental para nossa personalidade, guia nosso comportamento e a todo momento faz com que relembremos de ações passadas (STERN e ALBERINI, 2013).

A memória não é adquirida de forma definida (BEKINSCHTEIN et al., 2008), mas tem função central na cognição humana, pois engloba as habilidades de adquirir, armazenar e evocar informações (LENT e KWON, 2004). Após receber a informação, nosso cérebro codifica e seleciona qual processo será armazenado, restando as informações pertinentes atribuídas a aquele indivíduo. Depois de armazenada, essa informação poderá ser evocada a qualquer momento, portanto a evocação nada mais é que, selecionar determinada lembrança e trazer à nível de consciência (STERN e ALBERINI, 2013). Desta forma, a memória é classificada em algumas fases como memória de trabalho, longo prazo e espacial (COWAN, 2008) .

2.3.1 Tipos De Memória

A memória de trabalho foi um termo utilizado por Miller et al. (1960), para se referir à memória como ela é usada para planejar e executar o comportamento. Ela serve para manutenção das informações, mantendo o processamento de outras adicionais (COWAN, 2008; STERN e ALBERINI, 2013), ou seja, ela retém resultados

parciais enquanto se resolve algum problema (COWAN, 2008; MILLER et al., 1960). Seguindo nessa linha, a “memória de trabalho” ou “curto prazo”, como também é chamada, é a capacidade de manter uma lembrança por um curto período de tempo, de segundos à minutos (COWAN, 2008). Quando seguimos instruções ou direções, bem como, anotar o número de um telefone ou não adicionar o mesmo ingrediente duas vezes ao fazer um bolo, tudo isso cabe à memória de trabalho manter durante alguns segundos/minutos a informação que está sendo processada (ALLOWAY et al., 2009).

Por outro lado, a memória de longa duração, pode ser evocada em dias, meses e até mesmo anos após o momento. A memória se torna consolidada, ou seja, um evento simples, pode ser evocado e a qualquer momento tornar-se consciente (STERN e ALBERINI, 2013). Toda o processo de consolidação da memória até a evocação, depende de estruturas moleculares (MCGAUGH, 2000). Elas envolvem mudança estrutural e síntese de novas proteínas, durante um processo que pode demorar horas-dias até que o evento se torne estável e consolidado, passível de evocação (KANDEL et al., 2014; MCGAUGH, 2000). Nesse tipo de memória, além de processos neurológicos bem estruturados a emoção é um subsídio importantíssimo que dá suporte para a fixação de acontecimentos na memória (PERGHER et al., 2006).

Complementando, a memória espacial está ligada a orientação de uma pessoa frente a um lugar que já esteve. Sendo assim, trata-se de localizar-se perante uma situação, examinando pontos de referência e situando-se através deles para se localizar e encontrar seu objetivo, seja uma entrada ou saída de uma rua, por exemplo (FOSTER et al., 2012; SHRAGER et al., 2007). Portanto, muitos processos neuroquímicos estão interligados na formação da memória, principalmente no que diz respeito a plasticidade sináptica, onde fatores tróficos estão envolvidos na sua regulação. Um deles, em especial associado com a memória, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) (KOWIANSKI et al., 2018; LEAL et al., 2017).

2.3.2 Mecanismos Relacionados A Memória

O BDNF é uma neurotrofina capaz de controlar o desenvolvimento, diferenciação e plasticidade das funções cerebrais ao longo da vida (KOWIANSKI et al., 2018; NAGAHARA e TUSZYNSKI, 2011). Ele é sintetizado como uma forma precursora, como pré-pro-BDNF no retículo endoplasmático (FOLTRAN e DIAZ,

2016). Após sofrer translocação para o complexo de Golgi, é clivado originando o pró-BDNF (KOWIANSKI et al., 2018). O pró-BDNF é clivado pela ação da enzima plasmina, dando origem a forma madura do BDNF (mBDNF) (FOLTRAN e DIAZ, 2016).

O pró-BDNF pode se ligar em um receptor denominado receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), membro da família dos receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), sinalizando cascatas até a ativação de Fator Nuclear Kappa B (NFkB), um mediador inflamatório, por exemplo (REICHARDT, 2006). Por outro lado, o mBDNF se liga com alta afinidade à receptores TrkB (tyrosine kinase B), um receptor localizado na membrana, esse por sua vez inicia uma dimerização de seus resíduos de tirosina intracelulares (KAPLAN e MILLER, 2000). Essa ligação ocasiona a ativação de vias tais como phospholipase C- γ , fosfatidilinositol 3-kinase e ERK (extracellular signal-regulated Kinase), que podem culminar na fosforilação do Elemento de resposta ligado ao cAMP (CREB) (STERN e ALBERINI, 2013).

O CREB, pode sinalizar outras cascatas envolvidas na transcrição de numerosos genes relacionados a plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal e formação da memória (KANDEL et al., 2014; STERN e ALBERINI, 2013). Desta forma, o BDNF e CREB contribuem cooperativamente para a formação da memória, sendo o CREB um regulador positivo da consolidação da memória e esta, por sua vez, é afetada pela regulação positiva da expressão de BDNF por CREB e *vice-versa* (SUZUKI et al., 2011). Estudos cada vez mais vem mostrando os efeitos do TCE ou de concussões recorrentes, induzindo déficit cognitivo sucessivamente aos eventos (FIDAN et al., 2016; LUO et al., 2017; MANNIX et al., 2014; MCCRORY et al., 2013b).

Sabendo que a concussão e o TCE ocasionam movimento restrito do cérebro com o crânio no momento do impacto e, como citado anteriormente, a consequência mais visível disto, tanto a curto quanto a longo prazo, é o prejuízo cognitivo (MCCRORY et al., 2013b), o qual pode ser ocasionado pela desregulação de diversas vias de sinalização no sistema nervoso central (SNC), como a via inflamatória, por exemplo (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Desse modo, sugere-se que concussões recorrentes simulam respostas similares as vistas em um insulto de TCE moderado no cérebro no que diz respeito a neuroinflamação, principalmente pela ativação de células da glia (FADEN et al., 2016).

2.4 INFLAMAÇÃO NO SNC

A glia conta com mais da metade das células do SNC de mamíferos, ela apoia e nutre os neurônios passivamente (ZUCHERO e BARRES, 2015). Dentre as células da glia estão os oligodendrócitos, células de Schwann, astrócitos e a micróglia. Os dois últimos, participam de um papel fundamental no SNC após um insulto. Os astrócitos são células de formato estrelado, compondo 40% das células da glia, sua função básica é fornecer metabólitos e fatores de crescimento para os neurônios (SOFRONIEW, 2009). Além disso, apoiam a formação de sinapses e plasticidade, regulam o equilíbrio extracelular de íons e neurotransmissores, participam na permeabilidade e manutenção da BBB (HERCULANO-HOUZEL, 2014; KHAKH e SOFRONIEW, 2015; SOFRONIEW, 2009). Eles também iniciam um papel de controlar o tráfego de células imunes, sendo capazes de perceber insultos, que interferem na homeostase do SNC, respondendo via secreção de citocinas e quimiocinas e ativando a defesa imunológica adaptativa (CORDIGLIERI e FARINA, 2010).

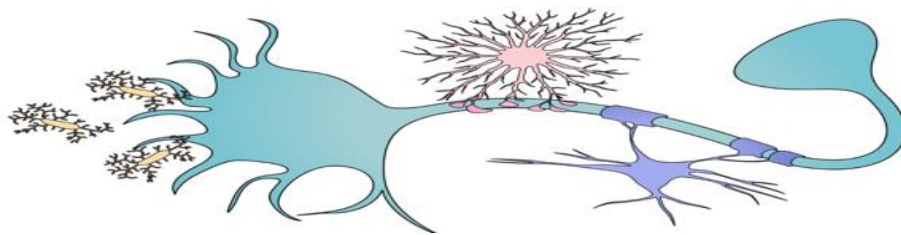


Figura 2. Representativo do neurônio e células da glia: oligodendrócitos, astrócitos e micróglia

A partir da liberação destas moléculas, há expressão de uma molécula denominada Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Desta forma, sendo amplamente utilizada para identificação da astrogliosis tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, e o seu aumento é relacionado com o início de uma patologia no cérebro (KHAKH e SOFRONIEW, 2015; SOFRONIEW, 2009). Sendo assim, o astrócito reage à citocinas inflamatórias como resposta adaptativa de manter a homeostase celular.

Durante um estado neuroinflamatório, o astrócito é regulado por uma citocina (interleucina-17), o qual resulta no recrutamento do fator nuclear kappa B (NFkB), que é translocado para o núcleo da célula após sua fosforilação, ocasionando a transcrição de genes pró-inflamatórios (QIAN et al., 2007). Estudos mostram que a inativação do NFkB em astrócitos melhora os resultados após dano cerebral, confirmando que ele pode estar envolvido em processos inflamatórios (KHOROOSHI et al., 2008).

Portanto, os astrócitos podem reagir a um estímulo externo e acabar ativando moléculas que podem sinalizar para a liberação de mediadores inflamatórios, em menor escala que a micróglia, mas contribuindo para a inflamação.

A micróglia também é uma célula da glia como o astrócito, ela é conhecida por influenciar no desenvolvimento e promoção da proliferação e sobrevivência neuronal, também conhecido por estado M2 ou estado de reparação (HANISCH e KETTENMANN, 2007; WOLF et al., 2017). Por outro lado, após um insulto patológico no cérebro ela torna-se ativada, ocasionando uma mudança no seu fenótipo morfológico, tomando forma ameboide, denominada estado M1 ou estado pró-inflamatório (HANISCH e KETTENMANN, 2007).

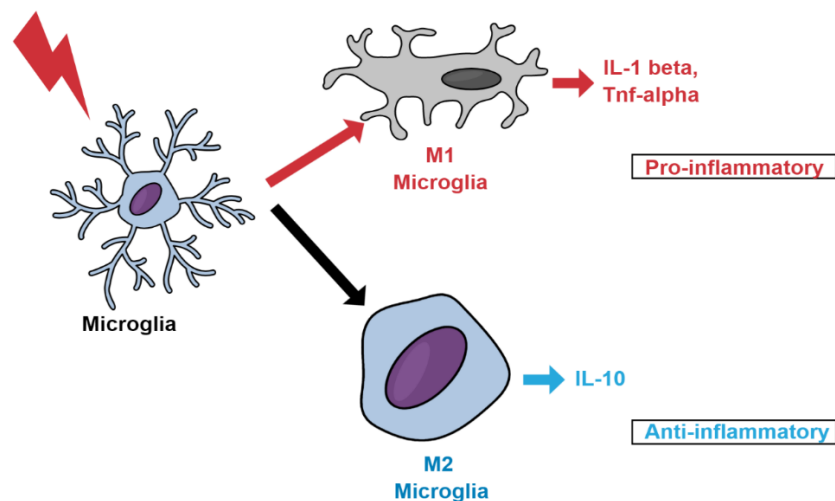


Figura 3. Desenho esquemático da micróglia. Em vermelho liberação de mediadores pró-inflamatório (M1) após um insulto na célula. Em contrapartida, em azul ativação de mediadores anti-inflamatórios (M2).

Sobre essa linha, entre os mediadores pró-inflamatórios liberados pela micróglia, salienta-se a Interleucina-1 beta (IL-1 β) e o Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), e não menos importante as Espécies reativas ao oxigênio (ROS). Estas moléculas são conhecidas por sinalizar outras cascatas que amplificam o estado inflamatório. Desta forma, em uma situação de estresse crônico ocasionado por um fator externo, como no caso das concussões recorrentes, pode vir a ocasionar uma ativação crônica nesta célula glial (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Como resultado, pode acarretar em neuroinflamação crônica, a qual está associada à algumas doenças como a Doença de Alzheimer e até mesmo a ETC, como citado anteriormente (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Porém, estudos revelam que o aumento do receptor nicotínico alpha 7 (nAChR α 7), pode contribuir de forma

benéfica, diminuindo a inflamação e conseqüentemente a ativação da micróglia M1 e sua disfunção diminuindo a inflamação (EGEA et al., 2015; PARADA et al., 2013).

2.4.1 Papel Do Receptor Nicotínico Alpha 7 Sobre A Inflamação No Snc

Os nAChR $\alpha 7$, são canais iônicos, que atuam sobre vários processos comportamentais no SNC, tais como memória, aprendizagem e atenção (EGEA et al., 2015). Por outro lado, também está envolvido nos processos biológicos do encéfalo, como plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal e neuro-proteção, bem como seu efeito sobre a inflamação (EGEA et al., 2015; PARADA et al., 2013; WANG et al., 2003). Usando PNU282987, um agonista de nAChR $\alpha 7$, os processos inflamatórios diminuíram em modelos da Doença de Alzheimer e TCE, mostrando que o efeito realmente é mediado pelo nAChR $\alpha 7$ (DASH et al., 2016; IBRAHIM ABDEL FATTAH et al., 2016; PINHEIRO et al., 2017). Desta forma, após o nAChR $\alpha 7$ ser ativado, ele sinaliza Jak2 que por sua vez culmina na inativação da cascata de translocação de NFkB, inativando a síntese de proteínas pró-inflamatórias (EGEA et al., 2015). Sobre essa linha, a inativação de NFkB ocasiona a translocação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao (Nrf-2) para o núcleo, aumentando a síntese de proteínas anti-inflamatórias e defesas antioxidantes, conseqüentemente diminuindo as ROS, demonstrando uma interação entre as duas proteínas (EGEA et al., 2015; SANDBERG et al., 2014).

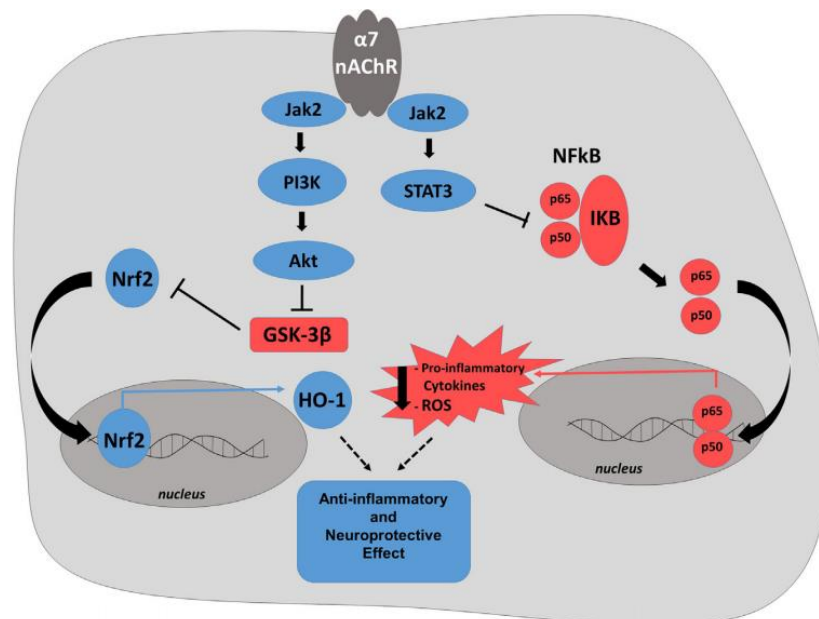


Figura 4. Esquema da ativação/desativação de Nrf-2 e NFkB, via nAChR $\alpha 7$ (EGEA et al., 2015)

O Nrf-2 é o maior regulador antioxidante e anti-inflamatório do cérebro, além de estar envolvido nestes processos, ele também é relacionado com o aumento de BDNF (KWAK et al., 2003). Desta forma, o Nrf-2 atua em vias de extrema importância, desde anti-inflamatória até aumentando neurotrofinas essenciais para sobrevivência neuronal. Nesse sentido, ele se torna alvo fundamental no estudo e tratamento de doenças que induzem um estado crônico de inflamação, como no caso do TCE, onde já foi visto que animais que não expressavam o gene do Nrf-2 apresentaram aumento de proteínas inflamatórias (JIN et al., 2009). Como uma forma alternativa de aumentar a expressão desta proteína, estudos tem mostrado que o exercício físico age diretamente sobre a expressão de Nrf-2, podendo ser utilizado como terapia para o tratamento de algumas doenças (ABREU et al., 2017; NARASIMHAN e RAJASEKARAN, 2016; TSOU et al., 2015).

2.5 EXERCÍCIO FÍSICO

Sabendo de seus efeitos benéficos, muitas pessoas têm aderido a rotina de exercícios físicos, tanto de força quanto corridas ou natação, visando sempre uma melhor qualidade de vida. Sabe-se que ele modula diversas vias bioquímicas que auxiliam no desenvolvimento, manutenção e homeostase do sistema periférico e SNC, independentemente da idade (MEEUSEN, 2014; NISHIGUCHI et al., 2015; PINBARRE e LAURIN, 2015; WALSH, J. J. e TSCHAKOVSKY, 2018). Um estudo que analisou fígado de ratos, após quatro semanas de corrida, mostrou que 105 genes foram regulados positivamente e outros 86 foram regulados negativamente, alguns com atividade desconhecida (AOI et al., 2004). Por outro lado, roedores submetidos a seis semanas de natação, demonstraram diminuição de ROS, previne de convulsões e talvez exerça um efeito profilático após o TCE (LIMA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Desta forma, o exercício físico tem sido amplamente utilizado como adjuvante no tratamento de algumas patologias (DE CASTRO et al., 2017; KARJALAINEN et al., 2015; PAILLARD et al., 2015; SILVA et al., 2013). Seu efeito já é bem descrito sobre mecanismos relacionados a plasticidade neuronal e memória (BINDER e SCHARFMAN, 2004; NEEPER et al., 1995).

Estudos mostram que o exercício aeróbico é capaz de autorregular e aumentar a expressão de BDNF, podendo induzir melhora na capacidade cognitiva (DISHMAN et al., 2006; PARRINI et al., 2017; YARROW et al., 2010). O efeito sobre a cognição, devido ao aumento de BDNF ocasionado pelo exercício físico também é visto em

doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (COELHO et al., 2014). Desta forma, o estímulo ocasionado pelo exercício físico consegue atingir vias de sinalização que culminam na melhora da aprendizagem e memória (AGUIAR et al., 2011). Portanto, os efeitos ocasionados pelo exercício físico exibem um perfil adaptativo e consegue modular proteínas envolvidas nos processos de formação de memória, bem como agir como um fator antioxidante.

Como mencionado acima, o exercício físico provoca um estresse no organismo que ativa vias de defesa antioxidante, na tentativa de diminuir os processos inflamatórios consequentes (DONE e TRAUSTADOTTIR, 2016). Sendo assim, ele é capaz de aumentar a síntese de proteínas relacionadas a este efeito benéfico, como o Nrf-2. Em uma situação normal, o Nrf-2 está ligado, no citosol, a uma proteína chamada Keap1, que inibe sua translocação, funcionando como um regulador negativo dele (CULLINAN et al., 2004). Sobre condições de estresse, o Nrf-2 se desassocia da Keap1, se translocando para dentro do núcleo e ativando elemento de resposta antioxidante (ARE), que transcreve enzimas antioxidantes (HAYES et al., 2010).

Por outro lado, o Nrf-2 pode ser ativado independentemente da Keap1, como ativação via Glicogeno sintase Quinase-3 (GSK-3) ou por uma via não canônica, por p62, que sequestra a Keap1 para degradação autofágica que leva a estabilização e transcrição de Nrf-2 (KOMATSU et al., 2010; RADA et al., 2011). Em contrapartida, o papel antioxidante não é apenas sobre o Nrf-2, pois um estudo mostrou que o nAChR $\alpha 7$ também aumenta após 11 semanas de corrida (MARILIA SILVA et al., 2016). Desta forma, como nAChR $\alpha 7$ também sinaliza vias para que o Nrf-2 seja transcrito, os dois podem estar intimamente envolvidos no processo antioxidante e anti-inflamatório, mostrando que o exercício físico pode ser utilizado como adjuvante no tratamento de algumas doenças (EGEA et al., 2015). Em contraponto, o exercício físico induz inflamação e estresse oxidativo durante sua fase aguda (PACKER e HOFFMAN-GOETZ, 2015).

Sabe-se que a intensidade do Exercício físico pode contribuir para o aumento de citocinas inflamatórias, sendo que, quanto mais intenso maior é a liberação de mediadores pró-inflamatórios (HAY et al., 2015; OSTROWSKI et al., 1999), que podem contribuir com os efeitos ocasionados por lesões cerebrais. Desta forma, o efeito benéfico que o exercício físico ocasionaria pode ser descompensado e ter um

efeito inverso. No caso, pode agravar os processos inflamatórios e contribuir para um amplificação e intensificação do dano ocasionado pelo TCE ou pela concussão. (OSTROWSKI et al., 1999).

O exercício físico tem-se mostrado eficaz no tratamento pós evento traumático cerebral, ou como um método preventivo, para diminuir os efeitos ocasionados pelo TCE, em modelo experimental (DA SILVA FIORIN et al., 2016; DE CASTRO et al., 2017; LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2013). No entanto, concussões recorrentes acontecem em 2/3 da população que é acometida por TCE, sendo a maior causa, principalmente devido ao choque corporal nos esportes de contato. Porém, mesmo com a alta porcentagem de concussão em envolvidos com esporte ou prática esportiva, não há registros na literatura sobre o efeito de concussões recorrentes e exercício físico juntos, apenas de formas individuais. O qual gera uma lacuna no entendimento se o exercício físico é benefício ou malefício seguido por concussões recorrentes e se o processo inflamatório estaria envolvido no dano cognitivo. Sendo assim, tornan-se necessário a realização de pesquisas que elucidem esta dúvida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do processo inflamatório na fisiopatologia do trauma cerebral em um modelo experimental de concussão recorrente no esporte

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- A) Avaliar se a concussão somada com o exercício físico ocasionaria déficit cognitivo;
- B) Determinar se a expressão e quantidade de proteínas inflamatórias e apoptóticas estaria influenciando no processo cognitivo;
- C) Verificar a expressão e quantidade de proteínas anti-inflamatórias e antioxidantes;
- D) Avaliar a expressão e quantidade de proteínas relacionadas a formação da memória;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Manuscrito

O desenvolvimento desta dissertação está apresentado sob a forma manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito.

RECURRENT CONCUSSION IMMEDIATELY AFTER SWIMMING PHYSICAL EXERCISE CAUSE NEUROINFLAMMATION AND DECREASE COGNITION OF JUVENILE RATS

Gustavo Cassol^{b,d}, Douglas Buchmann Godinho^d, Leandro Severo^{ad}, Marlon Régis Leite^a, Kalyne Bertolin^c, Alfredo Quites Antoniazzi^c, Cristina Wayne Nogueira^a, Michele Rechia Fighera^{a,d}; Luiz Fernando Freire Royes^{a,b,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900

Santa Maria, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Educação Física

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900

Santa Maria, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFSM

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900

Santa Maria- RS, Brasil

^d Laboratório de Bioquímica do Exercício

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900

Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author: Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas

Centro de Educação Física e Desportos

Universidade Federal de Santa Maria,

97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.

FAX: +55 55 3220 8031

e-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

Abstract

Concussion is closely linked to contact sports, as they usually happen during sports practice. Teens are one of the most affected due to increasing encouragement to contact sports such as NFL, Rugby and even football. We submitted the juvenile rats to two concussion each week immediately after physical exercise (swimming) during five weeks. Seventy-two hours after the last concussion, we conducted the behavioral tests, such as open field, object recognition and Barnes maze. Twenty-four hours after the last behavioral test, the animals were euthanized and the hippocampus was removed for further biochemical analyzes for RT-PCR (mRNA NF κ B, IL-1 β , TNF- α , casp3, nAChR α 7, Nfe2l2, BDNF, Ntrk2 and CREB1) and Western Blotting assay (Iba-1, GFAP, TNF- α , caspase-3, nAChR α 7, SOD2, mBDNF, TrkB and phospho-CREB). Statistical analysis revealed that recurrent concussions induced cognitive impairment in long-term memory (LTM) in exercise animals. Biochemical analyzes reveal that recurrent concussions induce increased expression of inflammatory and apoptotic genes such as mRNA NF κ B, IL-1 β and caspase-3 in sedentary rats. In addition, an increase in TNF- α was observed in the animals concussion exercise when compared to sedentary concussion. This shows that, physical exercise did not potentiate the damage caused by concussion in the mRNA of these proteins. The mRNA nAChR α 7 was shown to be decreased in the sedentary concussion group in relation to the sedentary control. The mRNA nAChR α 7 expression was not potentiated in the concussion exercise group. No statistical difference was seen in the mRNA Nfe2l2. Analysis of anti-inflammatory proteins by Western blotting revealed that, a decrease in nAChR α 7 levels in the sedentary concussion group was observed relative to the sedentary control. However, when we evaluated the levels of the antioxidant enzyme SOD2, only the concussion exercise group was shown to be decreased when compared to exercise control. Our data reveal that recurrent concussions do not induce GFAP increase. However, physical exercise potentiated the content of inflammatory proteins such as Iba-1, TNF- α , as well as the apoptotic caspase-3 protein. On the other hand, concussion does not alter the BDNF gene expression, but the mBDNF decreases in the sedentary concussion when compared to the exercise control. Regarding gene expression for TrkB, the Ntrk2 mRNA, both concussion groups were increased relative to the sedentary control, but the concussion effect did not differ in TrkB content. Thus, in both concussion groups the CREB1 mRNA was shown to be increased in relation to the sedentary control, whereas, the amount of phospho-CREB was only decreased in the concussion groups in relation to the exercise control. Our data show that concussion plus physical exercise exhibits an increase in inflammatory proteins, decreasing the amount of some memory-related proteins and that only concussion alone does not exert behavioral damage. In summary, this protocol caused a little insult on brain, indicated that recurrent concussion need more attention and new alternatives and protocols are needed to elucidate the gaps.

Keywords: Concussion; Young; adolescence; inflammation; memory; TBI; recurrent concussion.

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is a silent disease, reaching about 2.5 million people annually in United States of America (USA) and about 45-60 million around the World (Barrio, Small et al. 2015, Gardner and Yaffe 2015, Taylor, Bell et al. 2017). This neurological injury is characterized by a combination of immediate mechanical dysfunction of the brain tissue, and secondary damage developed over a period of hours to days following the injury. A consensus based on evidence considers that about 90 per cent of TBI are mild TBI or concussion (Control and Prevention 2003, Organization 2006). Furthermore, Sports-related concussions (SRCs) are traumatic events that affect up to 3.8 million athletes per year (Hobbs, Young et al. 2016).

In general, a concussion is defined as a traumatically induced transient disturbance of neurological function caused by a complex pathophysiological process (Harmon et al., 2013). This neurological injury is rarely recognized in a timely manner because symptoms often do not manifest for some time after the injury and the consequences of concussion can be long lasting. Regards pathophysiology induced by recurrent concussion (RC) in contact sports participants, a considerable body of evidence has demonstrated that oxidative -related cascades have been implicated in altered signal transduction in Central Nervous System (CNS) (Weaver, Lucero et al. 2015, Prince and Bruhns 2017, Meconi, Wortman et al. 2018). The rapid release of neurotransmitters, efflux of K^+ and influx of Na^+ and Ca^{2+} activates protease calpain and triggers calpain-mediated proteolysis of the cytoskeletal proteins, a process that can potentially lead to irreversible axonal pathology (McKee, Stein et al. 2013). To restore the ionic balance, the neuronal glucose consumption increase depletes the energy stores, leading to events of impaired oxidative metabolism characterized by lactate production and cerebral edema (Ling, Hardy et al. 2015). These neurochemical irregularities in conjunction with chronic inflammatory processes can result in post concussive disease, which spans a spectrum of diseases including post-concussion syndrome (PCS), prolonged PCS (PPCS), chronic traumatic encephalopathy (CTE) and mild cognitive impairment (Hobbs, Young et al. 2016).

Theoretically there is a time window of increased brain vulnerability due to the impaired cellular energy metabolism, during which a repetitive injury may worsen these neurochemical derangements, leading to more significant cognitive deficits and prolonged recovery. For instance, high school students that practice contact sports,

13,2% are victims of recurrent concussions and have long-term behavioral symptoms like anxiety and cognitive deficits (Castile, Collins et al. 2012). Indeed, athletes that return to play prior to symptom resolution predispose increase the severity of symptoms elicited by this neurologic injury ((Lovell and Collins 1998, Longhi, Saatman et al. 2005, Shrey, Griesbach et al. 2011). Following a sport-recurrent concussion (SRC), the Central nervous System (CNS) recruits neutrophils and monocytes, which in combination with the microglia and astrocytes secrete inflammatory cytokines. The influx of leukocytes to inflammatory site is orchestrated by a sequential upregulation of adhesion molecules on vascular endothelium leading post-traumatic edema and breakdown of the BBB (Baskaya, Rao et al. 1997, Unterberg, Stroop et al. 1997). In addition, an increase of cerebral tissue water content and BBB dysfunction after TBI causes delayed neuronal dysfunction and death through secondary processes involving increased excitatory amino acids levels and loss of ionic equilibrium (Shlosberg, Benifla et al. , Lenzlinger, Saatman et al. 2004, Shlosberg, Benifla et al. 2010). These processes also alter the signaling molecules to organize an immunological response evidenced by upregulated of cytokines for a longer period (Truettner, Bramlett et al. 2018).

In rodent models, the concussion-induced cytokine response is remarkably complex but is thought to typically begin with an increase in the proinflammatory molecules interleukin IL-1 α , IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α)(Dalgard, Cole et al. 2012). While levels of IL-1 α , show an acute elevation and fall, IL-1 β levels tend to remain elevated for a longer period, rising in an amount relative to the severity of the trauma as well as if the concussion is associated with a contusion (Holmin, Schalling et al. 1997, Yu, Yhee et al. 2011). However, although chronic neuroinflammation has implicated in the pathophysiology of concussion more work is needed to determine how the severity of brain injury alters inflammatory signaling, the time course for its toxic activity, and how cytokines alter the signaling molecules involved in the memory. There is also a growing interest to investigate the role of inflammation in the pathophysiology induced by sport-recurrent concussion SRC, particularly with regard to post concussive disorder including by cognitive impairment. For this purpose we decided investigate whether inflammatory response exacerbates the pathophysiology of brain trauma in a model of sport-recurrent concussion.

Methods

Animals, Ethics Statement, and Reagents

Male Wistar rats (54) that were 30 days old (DO), supplied from our own breeding colony, were used in this study. The animals were housed two animals per cage (polypropylene, 41 × 34 × 16 cm *L × W × H*, 1394 cm²) with the floor covered with autoclaved shavings under controlled conditions (12:12-h light-dark cycle, lights turned on at 07:00 a.m.; the temperature were monitored in real time 24 ± 1 °C (Foxlot, Internet of Things, model TWP28) ; 55 % relative humidity) on a ventilated rack (Alesco, model FS2), with access to water and food (Puro Lab 22 PB) *ad libitum*. The present experimental study was approved by the Institutional Ethics Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil and registered under the number 5286220617. The reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Bio-Rad. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

Animals weight, food and water consumption

The weight, feed intake and water consumption of the animals was monitored during every day of protocol, including on the days of rest. The feed and water were measured by (consumption of the day- daily amount/number animals in cage).

Unconsciousness Time

After each contact of weight with animal head, the timer were shot. This method were to available the time that animal stayed unconscious. Were considered return of conscious when the rat stayed in supination position again.

Experimental Design

The events of recurrent concussion are showed in time line below:

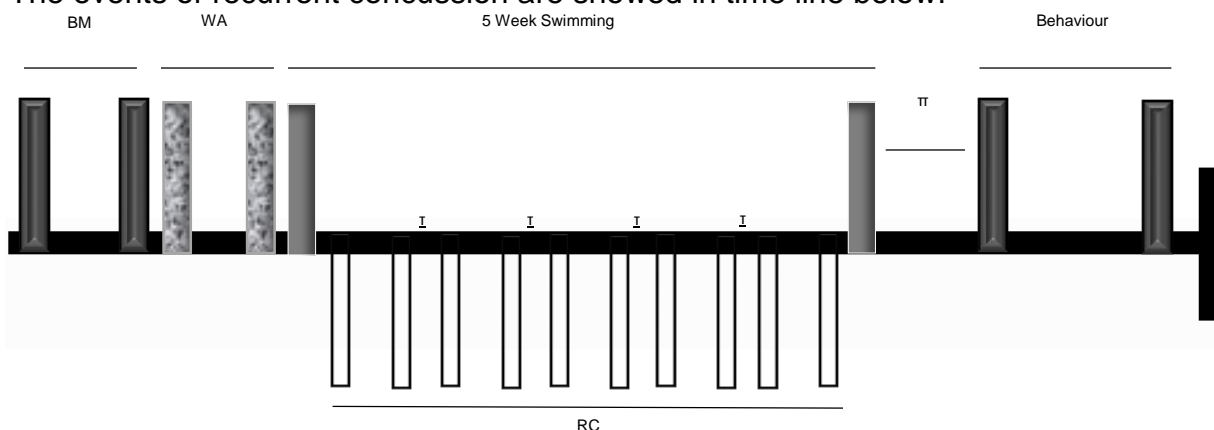


Figure 1: The animals were trained in Barnes Maze, 34DO until 37DO. Either, 24h after last training of BM, the animals were placed in water adaptation (5cm deep) during an hour each day, for three days.

This way, 24h after last water adaptation, the animals begin the swimming protocol, five days of training and two days break (τ), until complete five weeks swam. In this protocol, concussions were made in second and fifth swimming day. Thus, with control, we put a limit of time of two minutes, between the animal leaving the pool, until receiving the concussion, totalizing ten concussions. Either, after 72h from recovery (π) last training day, the rats begin the battery behavioral tests: Open Field (OF) in 76DO, Object location test (OLT) in 77DO, Object recognition test (ORT) in 78-79DO and Barnes Maze (BM) in 79DO. The control animals receive the same treatment, except concussion, the euthanasia were in 80DO.

Recurrent Concussion

Recurrent concussion (RC) were made using weight drop model, based on (Mannix, Berglass et al. 2014), with modifications. The animals received 10 concussion with interval of 72h and 96h each, two times on week during five weeks. Before the concussion process, the animals received lidocaine topical on head (Mychasiuk, Farran et al. 2014). The rats were anesthetized (isoflurane, 1 % inhaled, Baxter), stayed on aluminum paper with small cuts along there. Below of aluminum paper, had sponges to cushion the drop of animal. Either, a trigger fires an acrylic weight of 54g (2,5cm diameter) free fall until the animal head, on a height 71,1cm (28 inches). A fishing line (0,30mm, Mazzaferro) supported the weight.

Swimming training protocol

The protocol of physical exercise were made like described by (Cardoso, Martins et al. 2013), with modifications only in number of weeks. The animals swam five weeks. Either, the first week, animals swimming without overload, second week received 2% body weight overload, from the third-to-five week received 5% body weight overload. The water were kept in $32^{\circ}\text{C}\pm 1$.

Behavioral tests

Barnes Maze (BM)

The BM is a validated test often used for the assessment of spatial learning and memory in rodents (Barnes 1979). The BM paradigm explore the natural condition the rodents have to scape of light until a dark place, because they to seek escape to a darkly lit, sheltered environment when placed in an open arena under bright, aversive illumination. Either, begin training BM on 34-37DO, with arrive BM test on 79DO.

Thus, twenty holes, 6cm diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5cm from it. The apparatus were located in a 4m \times 4m test room where four visuospatial cues made of rigid black paper (rectangle, circle, cross, triangle) were affixed to the walls but not directly over any one maze hole, selected randomly for each rat but remained constant throughout the training sessions for a given rat. The

remaining 19 holes led only to a false escape box (15cm×10cm×10cm) which, from the platform, appeared indistinguishable from an escape box but was too small to be entered; false boxes removed visual cues that might be observed through an open hole. Above the platform, there is an incandescent lamp (200w), which gave bright illumination of the BM as the aversive stimuli.

On the first day of experiment, the rats were moved to testing room and left undisturbed for 60min. Following this habituation, the rats were trained to find the escape hole. They were placed in the escape box for 30 seconds, then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the BM. With light on, the start box were removed and the animal allowed exploring freely and finding the escape box. A maximum latency of 180 seconds to find it was allowed. Each rat was given two trials per day, over four consecutive days. In each trial, we scored the time to find the escape tunnel and the numbers of wrong holes visited. The arena as well boxes were wiped clean using Alcohol 30% and after distilled water both between each training session for a given rat and between each rat.

Open field test (OF)

The OF were made with describe above in experimental design, the protocol made OF in 76DO, with the purpose of identifying possible sensorimotor effects induced by swimming or concussion to rats. The apparatus consists in a 40 cm × 45 cm arena, with 50-cm-high walls, made of plywood, with the floor divided into nine (3 × 3) equal squares by black lines. The animals were placed in the center of the arena to explore the field freely for 5 min, and the numbers of crossings and rearings were recorded (Walsh and Cummins 1976). The OF was used as a context habituation trial for the recognition memory test (de Lima, Laranja et al. 2005).

Object location test (OLT)

Twenty-four hours after the OF, the training session was carried out by placing individual rats for 5 min in the field, in which two identical objects (objects 1A and 2A) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. The OLT was carried out with the field used in the OF and the objects (1A and C). The OLT, a hippocampus-dependent spatial memory test, was performed 4 h after the training. In the test session, the object C was moved to a location that was diagonally opposite to object 1A, and the rat was left in the field for 5 min exploration (De Rosa et al. 2005). The

exploration criterion and the results were expressed as described in the 'Object recognition test (ORT)' subsection.

Object recognition test (ORT)

The ORT was used to investigate memory impairments induced by recurrent concussions. Twenty-four hours after the OLT, the training session was carried out by placing individual rats for 5 min in the field, in which two new identical objects (objects 1A and 2A) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. This way, an hour and a half after the training session, the rats performed the short-term memory (STM) test, in which rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar object (1A) and one novel object (B). The long-term memory (LTM) test were carried out 24 h after the training session, when the same animals explored the field for 5 min in the presence of one familiar object (1A) and one novel object (C). The objects used in this study were made from four identical Lego bricks (Lego toys). All objects used in this test had similar textures, colors (blue, green, red and yellow) and sizes, but distinctive shapes, and their location was the same during the experiment. The results for both tests (STM and LTM) were expressed as exploratory preference; a recognition index was calculated for each animal by the ratio $TB/(TA+TB) \times 100$, where TA is the time spent exploring the familiar object A, and TB is the time spent exploring the novel object B.

Ex Vivo Assays

RNA isolation, Reverse Transcription and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Total RNA from hippocampi was extracted using TRIzol® as per instructions of manufacturer. Quantification of RNA was performed using a Nano-Drop spectrophotometer, and the RNA purity was assessed by the 260/280 nm absorbance ratio (Thermo Scientific). RNA was treated with 0.1U DNase Amplification Grade (Invitrogen) for 15 min at 27°C, followed by DNase inactivation with 1µl of EDTA at 65°C for 10min. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 300 ng of total RNA with random hexamer primers using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reactions (qRT-PCR) were conducted in a CFX384 thermocycler (BioRad) using BRYT Green® dye and Taq DNA polymerase from GoTaq® qPCR Master Mix (Promega

Corporation), with 7.5 ng of cDNA in 10 μ l. A common thermal cycling program (standard two-step qRT-PCR with initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 3 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 seconds and annealing/extension at 60 $^{\circ}$ C for 1 minute) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses were performed to verify product identity. Primers were validated by standard curves and the sequences are listed in Table xxx. Reactions with a coefficient of determination (R²) higher than 0.98 and efficiency between 85 to 110% were considered optimized. Samples were run in duplicate and the results are expressed relative to Ywhaz and Pgk1 levels. Data were then normalized to a calibrator sample using $\Delta\Delta$ Cq method as previously described (Pfaffl 2001).

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CHRNA7	TTCTCCTCTATAACAGTGCTGATGA	AAAGGGAACCAGCGAACGTC
IL1B	CCAGTCAGGCTTCCTTGTGC	ACAGGTCATTCTCCTCACTGTCCG
TNF	TCGGTCCCAACAAGGAGGAG	CTCCGCTTGGTGGTTTGCTAC
Ntrk2	GGGAGCATCTCTCGGTCTATGC	ACCCATCCAGGGGGATCTTATG
BDNF	CTTTGGGGCAGACGAGAAAGC	CACCTGGTGGAACCTCAGGGTC
Creb1	TGAGGAGCTTGTACCACCG	ATGGATACCTGGGCTAATGTGG
Nfe2l2	CATTTGTAGATGACCATGAGTCGC	GCTCCATGTCCTGCTGTATGC
Nfkb1	GCAGACGACGATCCTTTTCGG	AGGTATGGGCCATCTGTTGAC
Casp3-F	GGAGCTTGGAACGCGAAGAA	CAGAGTCCATCGACTTGCTTCC
Ywhaz-F	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG	GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC
Pgk1-F	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC	AGCCACAGCCTCAGCATATTTT

Table 1. Sequences of the primers used for quantitative PCR amplifications

Western Blotting

Western blot analysis was performed according to (Funck, Ribeiro et al. 2014) with some modifications. Samples of cerebral hippocampus were lysed on ice in RIPA (radio-immunoprecipitation assay) and centrifuged for 20 min at 12.700 \times g and 4 $^{\circ}$ C. The protein concentration of each sample was determined by the bicinchoninic acid protein assay (Termo Fisher Scientific). Samples (30 μ g protein) were then subjected to an 4-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane using Trans-Blot $^{\circ}$ TurboTM Transfer System and equal protein loading was confirmed by Ponceau S solution (Sigma Aldrich - P7170). After specific blocking, the blots were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with rabbit anti-Iba-1 ionized calcium binding adapter molecule 1 (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), caspase-3 (sc-7148, 1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-GFAP glial fibrillary acidic protein (1:1000; Dako). SOD-2 Antibody (FL-222, sc-30080 1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 7 antibody (ab10096, 1:500 Abcam).

BDNF antibody (1:1000, Cell Signaling). TRKB antibody (1:1000, Cell Signaling), TNF α Antibody (N-19, 1:1000 sc-1350 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). CREB-P(ab3442, 1:1000 Millipore).

Mouse anti- β -actin (1:10.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was stained as additional control of the protein loading. After primary antibody incubation, membranes were washed with TBS-T (TBS plus 0.1% Tween 20) two times at room temperature for 10 min and incubated with anti-rabbit (Sigma Aldrich – A6154) or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology – sc-2005) secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:5000), for 2h at room temperature. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence using ECL Western Blotting Substrate (Pierce ECL, BioRad) and the signals were captured with fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad). Then the bands were quantified by using Image Lab software (Bio-Rad).

Statistical analysis

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

RESULTS

Behavioral Tests

Figure 2 shows the OF test, the crossing (A) and rearing (B). The OF test was used to evaluate locomotor activity, as well as habituation to OLT and ORT test. The two-way ANOVA showed that do not have interaction for the number of crossings ($F(1,32) = 0,05668$ $P = 0,8133$; fig.2A). In number of rearing, also do not have difference significant between interaction groups ($F(1, 42) = 0,4035$ $p = 0,5287$; fig.2B). This data support that this concussion model do not causes motor deficits in animals.

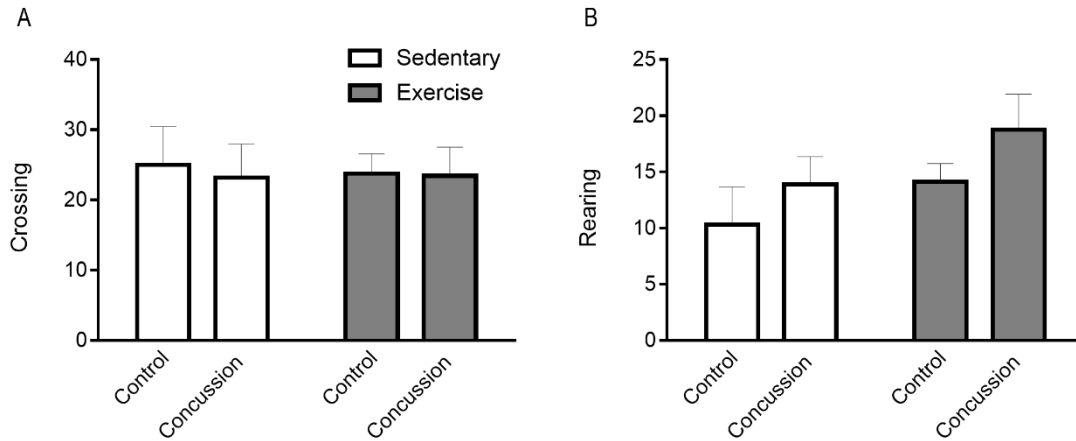


Figure 2. Effect of physical exercise and concussion on exploratory behavior, and motor coordination. The spontaneous locomotor activity of rats in number of crossing (A), number of rearing (B). Values are expressed as the mean \pm SEM for nine animals per group. * $p < 0.05$ were considered significant (two-way ANOVA).

Figure 3 shows the training from OLT (A), OLT test (B), training from ORT-STM (C), ORT-STM test (D) and ORT-LTM test. The OLT and ORT test was carried to assess the effect of physical exercise and/or concussion in memory. Our results in training phase from OLT and OLT test showed that do not have differences between group ($F(1, 32) = 0,07505$; $P=0,7859$; Fig.3a and ($F(1, 32) = 0,003897$; $P=0,9506$; Fig.3b). Moreover, we do not see difference in interaction on ORT training ($F(1, 32) = 0,06639$; $P=0,7983$; Fig.3c) and ORT-STM ($F(1, 32) = 0,5362$ $P=0,4693$; Fig.3D). However, in ORT-LTM, the posthoc analysis showed differences between sedentary control \times concussion exercise in exploratory preference ($F(1, 32) = 5,302$; $P=0,0279$; Fig.3e).

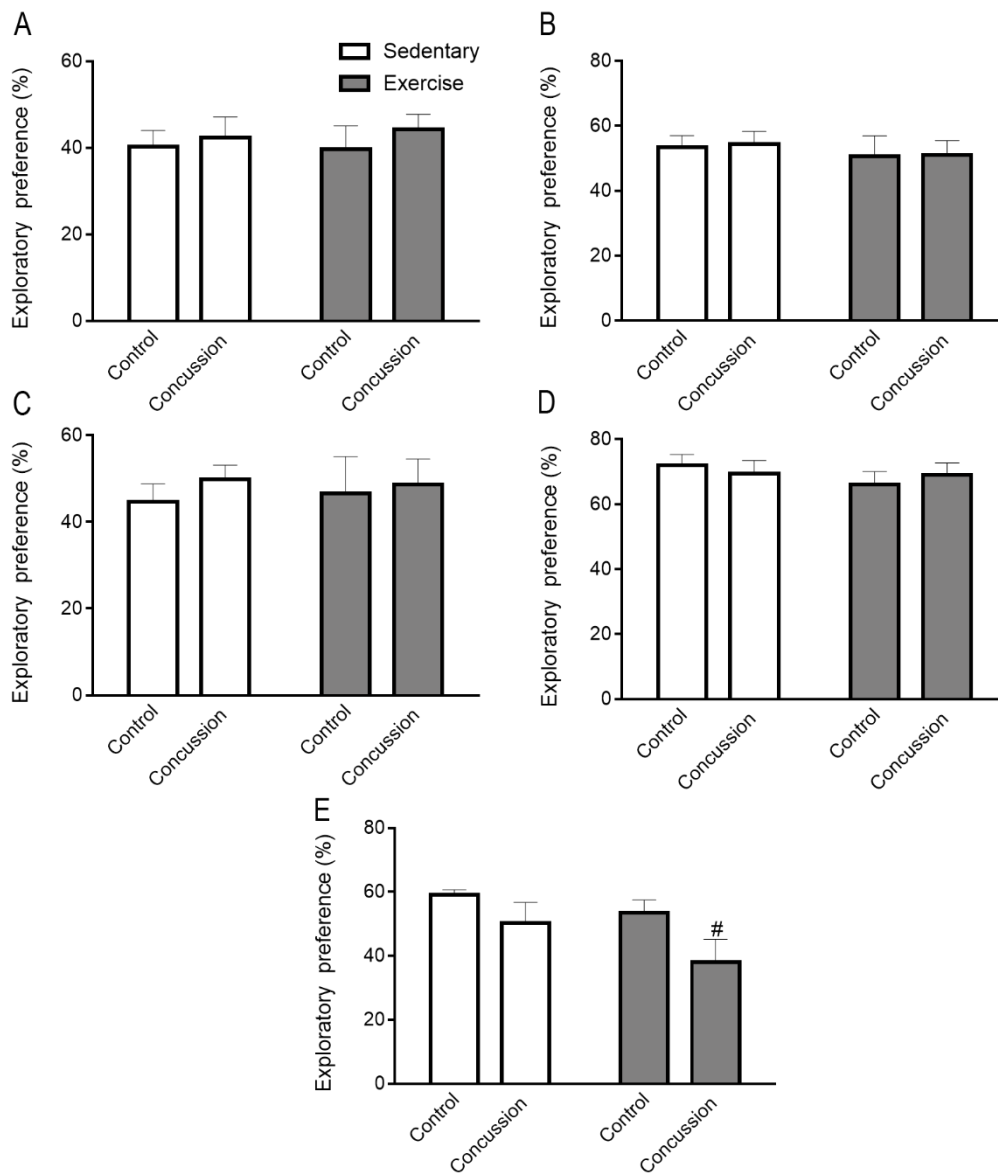


Figure 3. Effect of physical exercise and concussion on localization, short-term and long-term memory. The training of OLT (A), the OLT test (b), the training of ORT-STM (C), the ORT-STM test (D), and the ORT-LTM test (E). Values are expressed as the mean \pm SEM for nine animals per group. # $p < 0.05$ were considered significant compared to the sedentary control group (two-way ANOVA with Tukey post hoc).

Figure 4. Shows the BM test, the latency to escape was measured (A) and the number of error until escape (B). As a way of complete the memory test above, the BM was carried. The latency to escape and number of error were carried to assess the effect of physical exercise and/or concussion in spatial memory. Our results showed that in latency to escape have differences between group sedentary control x exercise control ($F(1, 33) = 10,38$ $p=0,0150$; Fig. 4a) and number of errors between sedentary concussion x exercise control ($F(1, 33) = 10,38$ $p= 0,0164$; Fig 4b). This dates support

that exercise improve the latency to escape and diminish the number of errors. The concussion exercise do not show differences when comparing with sedentary control.

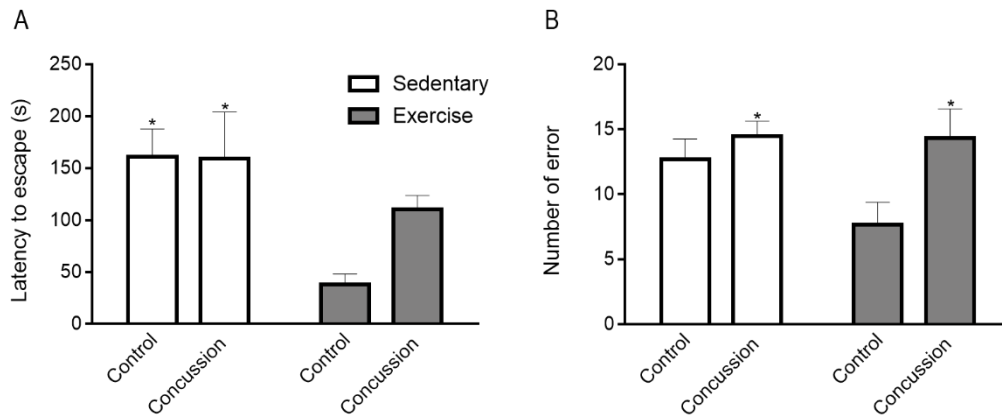


Figure 4. Effect of physical exercise and concussion on spatial memory. The latency time to escape (A), and the number of error (b) Values was expressed as the mean \pm SEM for nine animals per group. * $p < 0.05$ was considered significant compared to the exercise control group (Two-way ANOVA with Tukey post hoc).

Ex Vivo Assays

Results of physical exercise and concussion on gene expression

Figure 5. Our results showed that concussion increase NF κ B gene expression ($F(1, 15) = 8,892$ $P=0,0093$; Fig.5a) in sedentary concussion \times sedentary control ($p < 0,0300$). As a result of increase NF κ B gene expression, cytokines like IL-1 β demonstrate significant increase in sedentary concussion \times sedentary control ($F(1, 15) = 7,033$ $P=0,0181$; Fig.5b). Even as IL-1 β , TNF- α also is a result of NF κ B, our results showed that have interaction in TNF- α ($F(1, 16) = 7,126$ $P=0,0168$; Fig.5c), significant differences between control exercise \times concussion exercise ($p=0,0416$). To complement our dates, apoptotic genes like caspase-3 was measured, dates showed differences between sedentary concussion \times sedentary control ($F(1, 15) = 4,857$ $P=0,0436$; Fig.5D)

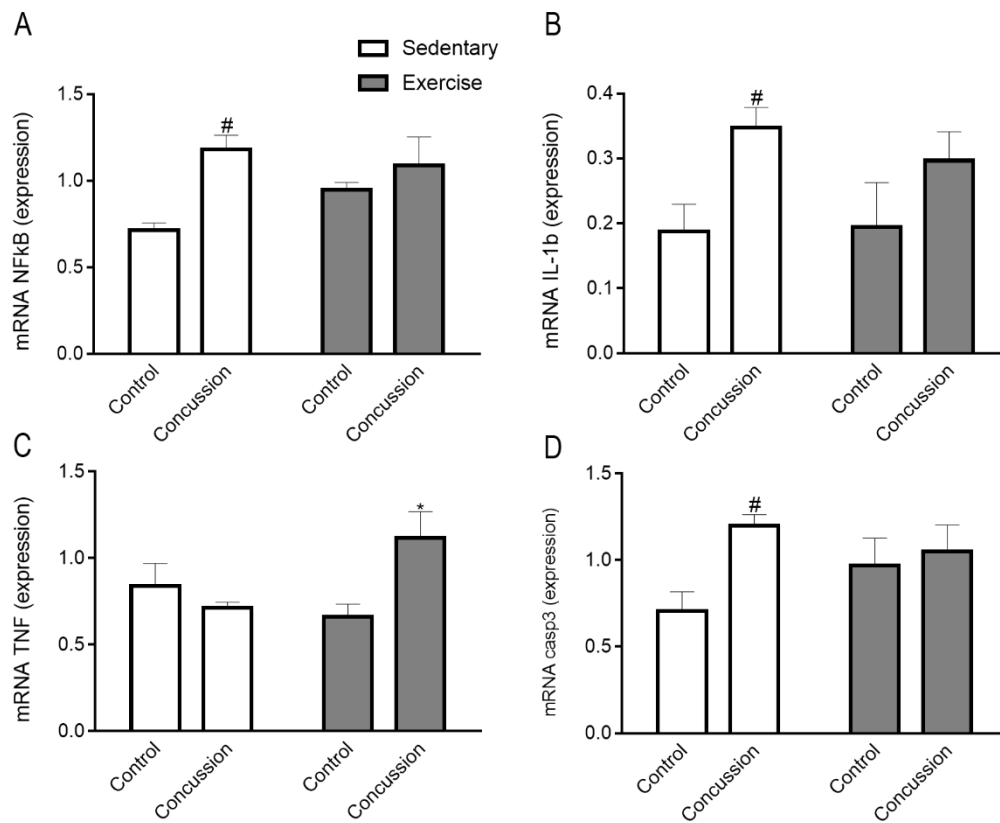


Figure 5. Effect of physical exercise and concussion on inflammatory and apoptotic gene expression. The NFκB, the major of inflammatory cytokines (A), the IL-1β, inflammatory cytokine (b), TNF-α also is inflammatory cytokine (c), and casp3 is an apoptotic gene (d). Values are expressed as the mean ± SEM, $p < 0.05$ was considered significant. * = the group difference × exercise control; # the group difference × sedentary control (Two-way ANOVA, with Tukey post hoc).

Figure 6. We assessed nAChR α7 and Nfe2l2, mainly anti-inflammatory genes. Our results showed significant differences, that sedentary concussion decrease gene expression when compared with sedentary control ($F(1, 16) = 8,653$ $P = 0,0096$). When we analyzed the Nfe2l2 gene expression, main anti-oxidant regulator, not differences between groups are seen ($F(1, 15) = 1,008$ $P = 0,3312$).

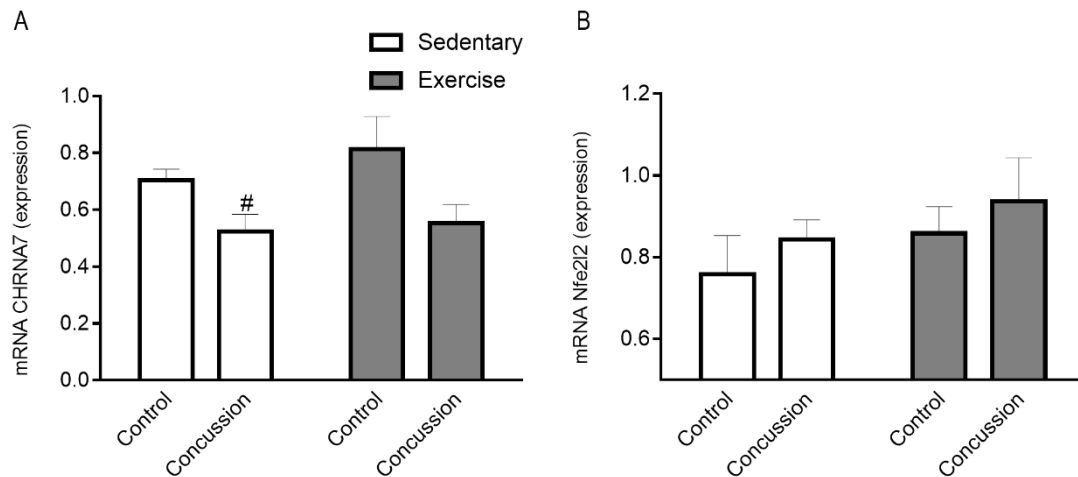


Figure 6. Effect of physical exercise and concussion on nAChR $\alpha 7$ and Nfe2l2 gene expression. The nAChR $\alpha 7$, the major of anti-inflammatory regulator (A), the Nfe2l2, antioxidant regulator (B). Values are expressed as the mean \pm SEM, $p < 0.05$ was considered significant. # = the group difference \times sedentary control (Two-way ANOVA).

Figure 7. This way, we assess genes associated with memory or plasticity are affected by physical exercise or concussion. Our results showed that gene expression of BDNF do not is affected ($F(1, 14) = 0,05201$ $P = 0,8229$). When we analyzed the Ntrk2, a gene responsible to TrkB transcription, our results showed statistical difference between groups ($F(1, 15) = 24,45$ $P = 0,0002$), the sedentary concussion \times sedentary control ($p = 0,0033$) and concussion exercise \times sedentary control ($p = 0,0047$). This way, the CREB1 gene expression have a significant difference increased ($F(1, 15) = 13,23$ $P = 0,0024$) in sedentary concussion \times sedentary control ($p = 0,0062$), and have a trend in concussion exercise \times sedentary control ($p = 0,052$).

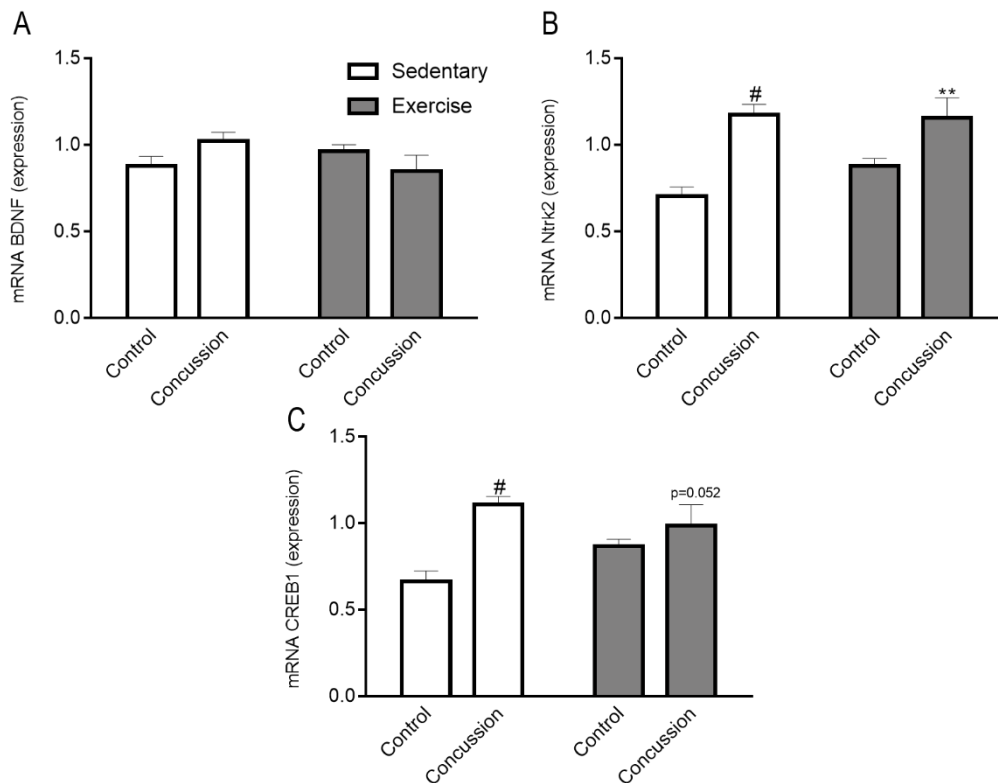


Figure 7. Effect of physical exercise and concussion on neuroplasticity. The BDNF (A), the Ntrk2 (B), and CREB1 (C). Values are expressed as the mean \pm SEM, $p < 0.05$ was considered significant. # The group difference \times sedentary control. **= difference between exercise control and sedentary control (Two-way ANOVA, post hoc Tukey).

Figure 8. Showed the content of inflammatory protein by western blotting analysis. As biochemical parameter, our group measured involved in inflammatory pathways. In western blotting assays, results showed that the group concussion exercise increase microglial activation by Iba-1 when compared with sedentary concussion group ($F(1, 18) = 6,412$ $P = 0,0428$; Fig 8a), a trend are seen concussion exercise \times exercise control ($p = 0,0733$). This way, as the astrocyte is also involved in inflammatory process, we measured GFAP, no significant differences between groups are seen in interaction ($F(1, 22) = 0,477$ $P = 0,4970$; Fig.8b). On this line, TNF- α is a product of inflammatory activation, with the objective of confirm the results of graphic 8a, we evaluated it. Then, the interaction was significant ($F(1,21) = 5,309$ $p = 0,0315$; Fig. 8c). However, concussion exercise showed a trend of increase when compared with sedentary concussion ($p = 0,0516$). How to evaluate if caspase-3 would be increased by consequence of inflammatory activation, we made this protein. Our analysis showed that the concussion exercise group increase the content of caspase-3 ($F(1, 18) = 7,584$

P=0,0131;Fig.8d) when compared with exercise control ($p=0,0341$) and sedentary control ($p=0,0260$).

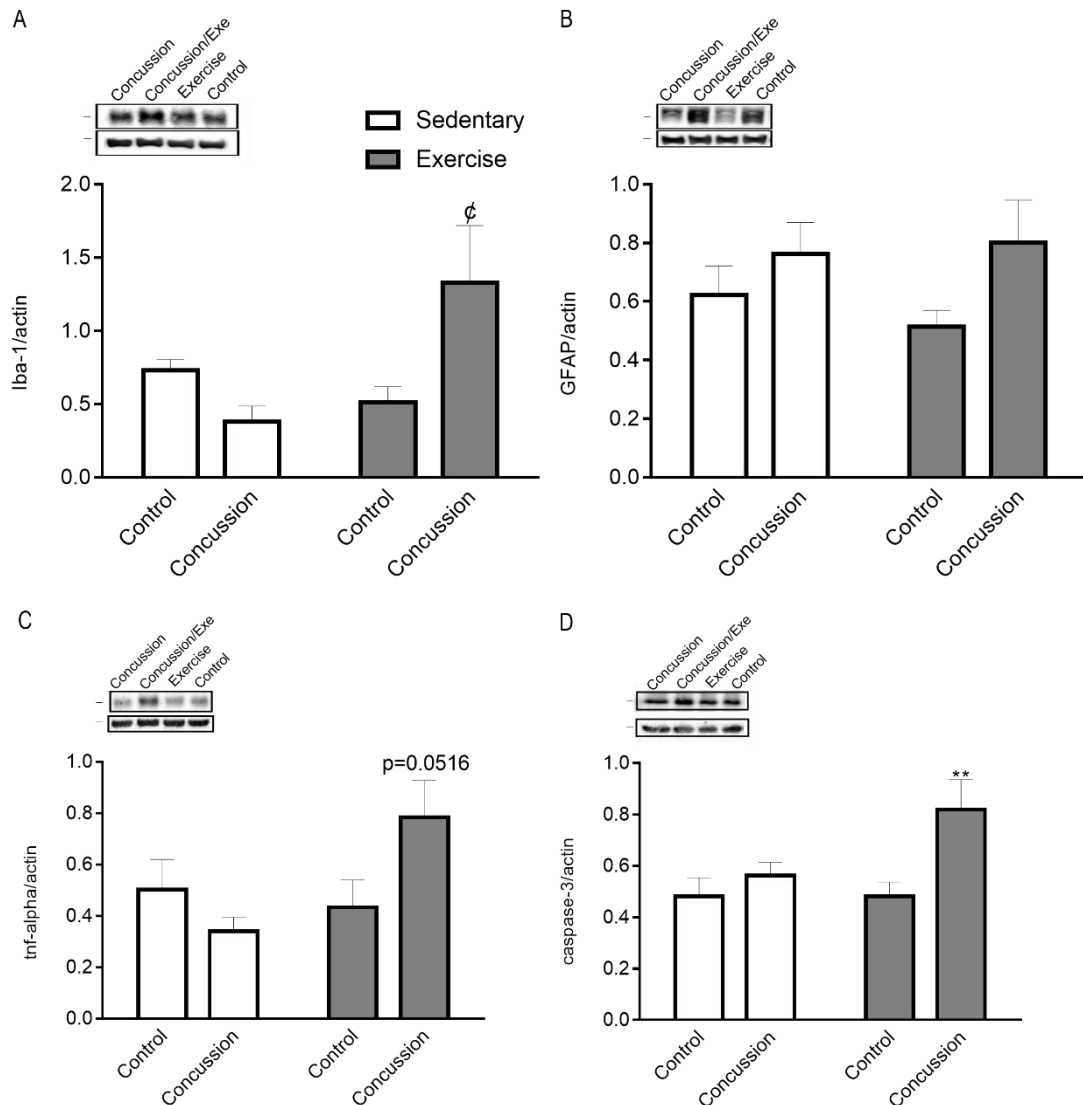


Figure 8. Effect of physical exercise and concussion on inflammatory and apoptotic proteins. The Iba-1 was made to assess microglial activation (A), the GFAP was made to assess astrocyte reactive (B), the TNF- α is an inflammatory cytokine (C), and caspase-3 is a apoptotic marker (D) Values are expressed as the mean \pm SEM, $p < 0.05$ was considered significant. ϕ = difference the group \times sedentary concussion, $**$ = difference between exercise control and sedentary control (Two-way ANOVA with Tukey post hoc).

Figure 9. Show the effects of physical exercise and concussion on nAChR $\alpha 7$ and SOD2.

The nAChR $\alpha 7$ was related by regulate anti-inflammatory pathways, with aim of investigate the influence of physical exercise and concussion on this protein. Our dates showed that have significate differences between groups, sedentary concussion \times sedentary control ($F(1, 19) = 10,57$ $p=0,0304$; Fig.9a). This dates demonstrated that concussion diminish nAChR $\alpha 7$ in hippocampus. The SOD2 was measured to verify if concussion was diminishing your content, our data showed that only the group concussion exercise decrease SOD2 protein when compared with control exercise group ($F(1, 21) = 10,23$ $p<0,0049$; Fig.9b)

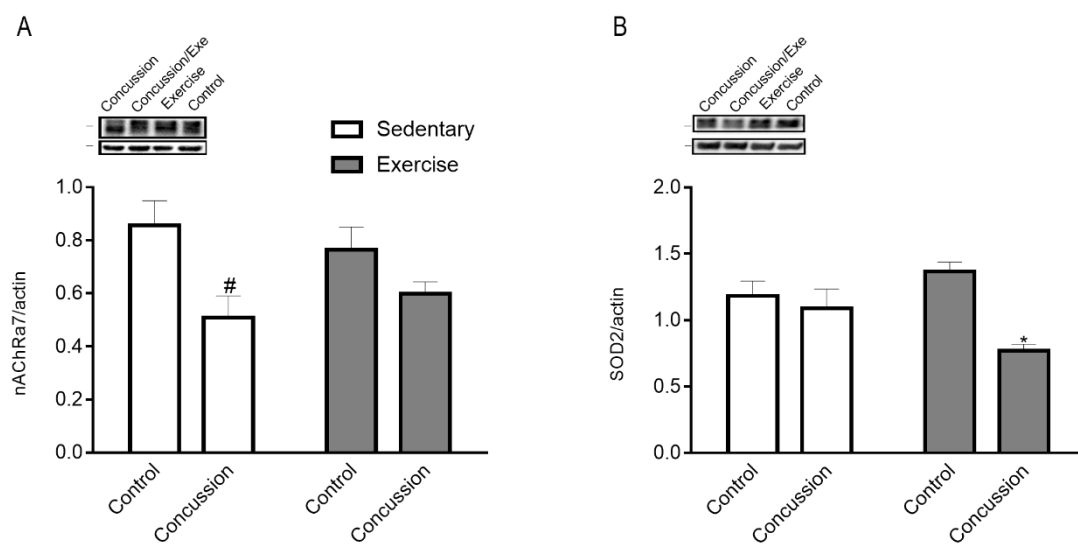


Figure 9. Effect of physical exercise and concussion on anti-inflammatory nAChR $\alpha 7$ and SOD2. The nAChR $\alpha 7$ (A), the SOD2, a scavenger protein (B). Values are expressed as the mean \pm SEM, $p<0.05$ was considered significant. #= difference the group \times sedentary control, *= difference between group \times control exercise (Two-way ANOVA with Tukey posthoc).

Figure 10. Show the effects of physical exercise and concussion on BDNF, TrkB and phospho-CREB. The BDNF was related by neuronal survive and plasticity, contribute to memory pathway, the effects of concussion ($F(1, 18) = 8,313$ $p=0,0099$; Fig.10a) only was seen when comparted control exercise \times sedentary concussion ($p<0,0180$). To evaluate if concussion or physical exercise in this protocol change the receptor for BDNF, we assess TrkB protein. Our dates showed that do not have significate differences between any groups in TrkB protein ($F(1,21) = 1,025$ $P=0,3228$; Fig.10b). How the phospho-CREB was related with process of memory formation, we evaluated this protein, and our results showed that physical exercise increase phosphor-creb ($F(1, 24) = 15,76$ $p=0,0006$; Fig.10c) when compared with sedentary concussion ($p=0,0234$) and concussion exercise (0,0010).

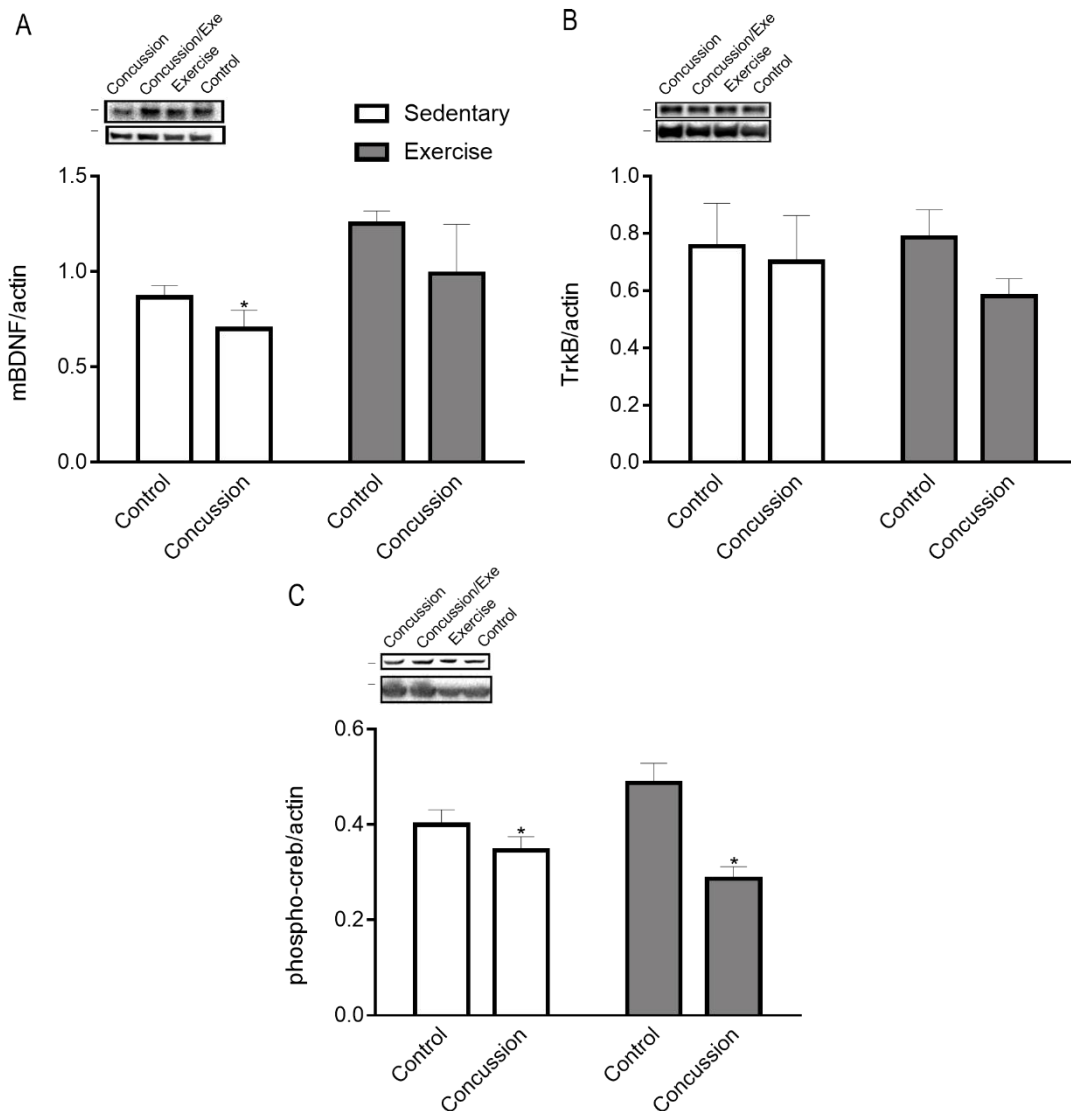


Figure 10. Effect of physical exercise and concussion on neuroplasticity and proteins related with memory. The mature BDNF (A), the TrkB, receptor for BDNF (b), and phospho-CREB, protein related with memory consolidation (c). Values are expressed as the mean \pm SEM, $p < 0.05$ was considered significant. *= difference between group \times control exercise (Two-way ANOVA with Tukey post hoc).

Discussion

Concussion affect about 3.8 million athletes per year, much people are in adolescence phase and the consequence that this event at young age can be devastating along the life, may be irreversible (McCrary, Meeuwisse et al. 2013, Hobbs, Young et al. 2016). This effect can be reinforced by contact sports, like NFL training in High School, for example (Castile, Collins et al. 2012). Based in this, very concussions models be created to reproduce the behavioral and neurochemical changes in brain, even so, the results for event are very differences in each closed

head injury to indices RC (Mannix, Berglass et al. 2014, Mychasiuk, Farran et al. 2014, Luo, Zou et al. 2017).

The mainly behavioral consequence is cognitive deficit, changes short and long-term are always followed by worse in memory process (McCrorry, Meeuwisse et al. 2013). As consequence this, the social life is direct impacted, causing often causing the appearance of another behavioral changes. One of the causes of these cognitive deficits can be caused by inflammatory state in brain (Collins-Praino and Corrigan 2017).

In note, the moment that happen the physical exercise, contribute to release cytokines for everybody, but the brain is protected by BBB. (Pedersen 2000, Daneman and Prat 2015). Thus, TBI causes a BBB disruption and the cytokines released by physical exercise, can contribute to increased inflammatory protein in brain (Hay, Johnson et al. 2015). Cytokines are involved in pathways that may have a direct link between cognitive deficit and inflammatory state in hippocampus after recurrent concussion (Collins-Praino and Corrigan 2017).

Behavioral alterations related to motor deficit observed after TBI in rodent are an important indicator to severity of damage (Fujimoto, Longhi et al. 2004). Thus, in RC motor deficit are seen only in models that use a bigger different proportion between weight animal vs weight drop used (Kane, Angoa-Perez et al. 2012, Mannix, Berglass et al. 2014). Data showed that our model do not exhibit difference in exploratory arena in number of crossing or rearing, this support that your model is characterized as mild recurrent concussion. The influence of sum between physical exercise and concussion do not show influence. This way, our data confirm the fact that concussion do not exhibit the same effect on exploratory activity seen in TBI (Ojo, Mouzon et al. 2016, Gerbatin, Cassol et al. 2017). Therefore, we investigate if memory was affected of concussion and which would be the effect of sum with physical exercise.

On this way, no differences are seen in any groups on OLT test and ORT-STM. However, when animals were tested in ORT-LTM, the sum of physical exercise and concussion demonstrate a decrease in preference exploratory. Thus, BM was carried to verify if the spatial memory was affected after a long-term of training until test. Following this line, just exercise group showed less time to escape and number of error. The cognitive damage can may not have been seen, because the interval between each concussion can help to recovery from brain damage and the age can

contribute for this recovery (Semple, Carlson et al. 2016). Therefore, the sum of physical exercise and concussion caused cognitive deficit in ORT-LTM.

The worse in memory after TBI or RC is being reported with inflammatory process (Collins-Praino and Corrigan 2017). From this perspective, we evaluated the main inflammatory proteins and genes. Our data showed that sedentary concussion increase mRNA from NFkB (Fig.5a) and IL-1 β (Fig.5b) when compared with sedentary control, but concussion exercise group do not showed increased in these genes. Studies showed that NFkB are increased in brain of immature rats submitted on TBI in immunohistochemical, supporting than this inflammatory mediator stay increased after TBI (Sanz, Acarin et al. 2002). Collaborating with dates above, recurrent concussion and moderate TBI demonstrate similar inflammatory behavioral in brain (Faden, Wu et al. 2016). To confirm if this process were caused by microglial activation or astrogliosis, we assess the Iba-1 and GFAP, showing that only concussion exercise group are increased Iba-1 when compared with sedentary concussion (Fig.8a), but not GFAP (Fig.8b). After RC, microglial activation and astrogliosis normally are seen (Kane, Angoa-Perez et al. 2012, Mannix, Berkner et al. 2017). This way, the sum of physical exercise and RC can intensify the concussion secondary damage. As a result of microglial activation, TNF- α is released, mRNA TNF- α (Fig.5c) and content of TNF- α (Fig.8c) only increased in concussion exercise group. Due to the close relationship between inflammation in hippocampus, mainly TNF- α and apoptosis proteins (Zhao, Bausano et al. 2001). We evaluated the caspase-3, a protein apoptotic member of proteases family, mRNA casp3 showed increased in sedentary concussion compared with sedentary control (Fig.5D). However in content protein only concussion exercise was increased with compared sedentary and exercise control (Fig.8D). This dates support that, the sum of concussion immediately after physical exercise during five weeks increase pro-inflammatory mediators.

To verify if physical exercise would can influence in anti-inflammatory markers, we evaluated mRNA and protein content from nAChR $\alpha 7$. This way, our dates showed a decreased of mRNA nAChR $\alpha 7$ in sedentary concussion when compared with sedentary control (Fig.6a), this dates are confirmed in content protein (Fig.9a), no statistical differences are seen concussion exercise. The decrease of nAChR $\alpha 7$ contribute positively to nuclei translocation of NFkB, increasing inflammatory state and releasing of cytokines like TNF- α or IL-1 β (Egea, Buendia et al. 2015). On this

line, is very known on peripheral inflammatory effects from physical exercise, and the sum of concussion with him can increase inflammatory state by diminish anti-inflammatory proteins like nAChR $\alpha 7$ (Pedersen 2000). The mRNA Nfe2l2, an antioxidant precursor gene are measured, no differences between groups was seen (Fig. 6b). However, the protein expression for SOD2, an antioxidant protein, decrease in concussion exercise group when compared with control exercise, no differences was seen in sedentary concussion (Fig. 9b). Dates above showed the consequence of physical stress in body with mild brain injury on inflammatory and apoptotic markers. All this inflammatory process is intimately related with cognitive deficit (Collins-Praino and Corrigan 2017).

To connect with behavioral dates, we analyzed mRNA BDNF and no differences was showed between groups (Fig.7a). However, when measured protein content of mature BDNF (14kDa), differences are seen only sedentary concussion and control exercise, but not sedentary control (Fig.10a). Inflammatory pathways analyzed in our work after RC do not have effect on BDNF. The mRNA Ntrk2 was increased in sedentary and concussion exercise compared with sedentary control (Fig.7b). This concussion effect no was seen in content protein of TrkB (truncated TrkB ~90kDa; Fig.10b). The increase in mRNA Ntrk2 in concussion groups no was seen in TrkB protein, may be due the our analysis just in truncated TrkB receptor and do not in full-length TrkB receptor (140kDa) and the Ntrk2 causes transcription of these two genes (Yacoubian and Lo 2000). However, the concussions group increased mRNA CREB1 in when compared with sedentary control (Fig.7c), may be this increase was a compensatory state. Because the concussions are performed with a big hours intervals between each injury. The phospho-CREB only was increased in exercise control group, compared with concussions group (Fig.10C), even if no statistical differences was seen in concussions groups in relation sedentary control. The concussion exercise exhibit a cognitive deficit seen in behavioral test (Fig.3c), but the western blotting analysis do not showed the same effect (Fig.10c).

In summary, concussion was a little insult on brain, though slow and succinct on several inflammatory and survives proteins, the effects on behavior begin appear of succinct form too (Omalu, Bailes et al. 2010). The age was an important factor to determinate if damage would be bigger or smaller. Briefly, metabolic alterations can be happen when sum physical exercise and concussion that contribute to subtle

damage in brain (supplementary data; Figure 11ab). We see that sum of age (juvenile), physical exercise and concussion can influence on memory and neurochemical. Our protocol also showed that have a distinct and intricate answer to this concussion model on memory. Therefore, this dates indicated that recurrent concussion need more attention and new alternatives and protocols are needed to elucidate the gaps.

References:

- Barnes, C. A. (1979). "Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat." J Comp Physiol Psychol **93**(1): 74-104.
- Barrio, J. R., G. W. Small, K. P. Wong, S. C. Huang, J. Liu, D. A. Merrill, C. C. Giza, R. P. Fitzsimmons, B. Omalu, J. Bailes and V. Kepe (2015). "In vivo characterization of chronic traumatic encephalopathy using [F-18]FDDNP PET brain imaging." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(16): E2039-2047.
- Baskaya, M. K., A. M. Rao, A. Dogan, D. Donaldson and R. J. Dempsey (1997). "The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats." Neurosci Lett **226**(1): 33-36.
- Cardoso, A. M., C. C. Martins, S. Fiorin Fda, R. Schmatz, F. H. Abdalla, J. Gutierrez, D. Zanini, A. M. Fiorenza, N. Stefanello, J. D. Serres, F. Carvalho, V. P. Castro, C. M. Mazzanti, L. F. Royes, A. Bello-Klein, J. F. Goularte, V. M. Morsch, M. D. Bagatini and M. R. Schetinger (2013). "Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats." Cell Biochem Funct **31**(2): 136-151.
- Castile, L., C. L. Collins, N. M. McIlvain and R. D. Comstock (2012). "The epidemiology of new versus recurrent sports concussions among high school athletes, 2005-2010." Br J Sports Med **46**(8): 603-610.
- Collins-Praino, L. E. and F. Corrigan (2017). "Does neuroinflammation drive the relationship between tau hyperphosphorylation and dementia development following traumatic brain injury?" Brain Behav Immun **60**: 369-382.
- Control, C. f. D. and Prevention (2003). "National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on mild traumatic brain injury in the United States: steps to prevent a serious public health problem." Centers for Disease Control and Prevention.
- Dalgard, C. L., J. T. Cole, W. Kean, J. Lucky, G. Sukumar, D. McMullen, H. B. Pollard and W. D. Watson (2012). "The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact." Frontiers in molecular neuroscience **5**: 6.
- Daneman, R. and A. Prat (2015). "The blood-brain barrier." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(1): a020412.
- de Lima, M. N., D. C. Laranja, F. Caldana, E. Bromberg, R. Roesler and N. Schroder (2005). "Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl." Exp Gerontol **40**(6): 506-511.
- Egea, J., I. Buendia, E. Parada, E. Navarro, R. Leon and M. G. Lopez (2015). "Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection." Biochem Pharmacol **97**(4): 463-472.
- Faden, A. I., J. Wu, B. A. Stoica and D. J. Loane (2016). "Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury." Br J Pharmacol **173**(4): 681-691.
- Fujimoto, S. T., L. Longhi, K. E. Saatman, V. Conte, N. Stocchetti and T. K. McIntosh (2004). "Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury." Neurosci Biobehav Rev **28**(4): 365-378.
- Funck, V. R., L. R. Ribeiro, L. M. Pereira, C. V. de Oliveira, J. Grigoletto, M. R. Figuera, L. F. Royes, A. F. Furian and M. S. Oliveira (2014). "Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit." Epilepsy Res **108**(10): 1705-1710.
- Gardner, R. C. and K. Yaffe (2015). "Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease." Mol Cell Neurosci **66**(Pt B): 75-80.
- Gerbatin, R. D. R., G. Cassol, F. Dobrachinski, A. P. O. Ferreira, C. B. Quines, I. D. D. Pace, G. L. Busanello, J. M. Gutierrez, C. W. Nogueira, M. S. Oliveira, F. A. Soares, V. M. Morsch, M. R. Figuera and L. F. F. Royes (2017). "Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation." Mol Neurobiol **54**(10): 7585-7596.
- Hay, J. R., V. E. Johnson, A. M. Young, D. H. Smith and W. Stewart (2015). "Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans." J Neuropathol Exp Neurol **74**(12): 1147-1157.

- Hobbs, J. G., J. S. Young and J. E. Bailes (2016). "Sports-related concussions: diagnosis, complications, and current management strategies." Neurosurg Focus **40**(4): E5.
- Holmin, S., M. Schalling, B. Höjeberg, A.-C. Sandberg Nordqvist, A.-K. Skeftruna and T. Mathiesen (1997). "Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion." Journal of neurosurgery **86**(3): 493-504.
- Kane, M. J., M. Angoa-Perez, D. I. Briggs, D. C. Viano, C. W. Kreipke and D. M. Kuhn (2012). "A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury." J Neurosci Methods **203**(1): 41-49.
- Lenzlinger, P. M., K. E. Saatman, R. C. Hoover, J. A. Cheney, F. M. Bareyre, R. Raghupathi, L. D. Arnold and T. K. McIntosh (2004). "Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats." Restor Neurol Neurosci **22**(2): 73-79.
- Ling, H., J. Hardy and H. Zetterberg (2015). "Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports." Mol Cell Neurosci **66**(Pt B): 114-122.
- Longhi, L., K. E. Saatman, S. Fujimoto, R. Raghupathi, D. F. Meaney, J. Davis, A. McMillan, V. Conte, H. L. Laurer and S. Stein (2005). "Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury." Neurosurgery **56**(2): 364-374.
- Lovell, M. R. and M. W. Collins (1998). "Neuropsychological assessment of the college football player." The Journal of head trauma rehabilitation **13**(2): 9-26.
- Luo, Y., H. Zou, Y. Wu, F. Cai, S. Zhang and W. Song (2017). "Mild traumatic brain injury induces memory deficits with alteration of gene expression profile." Sci Rep **7**(1): 10846.
- Mannix, R., J. Berglass, J. Berkner, P. Moleus, J. Qiu, N. Andrews, G. Gunner, L. Berglass, L. L. Jantzie, S. Robinson and W. P. Meehan, 3rd (2014). "Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury." J Neurosurg **121**(6): 1342-1350.
- Mannix, R., J. Berkner, Z. Mei, S. Alcon, J. Hashim, S. Robinson, L. Jantzie, W. P. Meehan, 3rd and J. Qiu (2017). "Adolescent Mice Demonstrate a Distinct Pattern of Injury after Repetitive Mild Traumatic Brain Injury." J Neurotrauma **34**(2): 495-504.
- McCrary, P., W. H. Meeuwisse, M. Aubry, B. Cantu, J. Dvorak, R. J. Echemendia, L. Engebretsen, K. Johnston, J. S. Kutcher, M. Raftery, A. Sills, B. W. Benson, G. A. Davis, R. G. Ellenbogen, K. Guskiewicz, S. A. Herring, G. L. Iverson, B. D. Jordan, J. Kissick, M. McCrea, A. S. McIntosh, D. Maddocks, M. Makdissi, L. Purcell, M. Putukian, K. Schneider, C. H. Tator and M. Turner (2013). "Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012." Br J Sports Med **47**(5): 250-258.
- McKee, A. C., T. D. Stein, C. J. Nowinski, R. A. Stern, D. H. Daneshvar, V. E. Alvarez, H.-S. Lee, G. Hall, S. M. Wojtowicz and C. M. Baugh (2013). "The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy." Brain **136**(1): 43-64.
- Meconi, A., R. C. Wortman, D. K. Wright, K. J. Neale, M. Clarkson, S. R. Shultz and B. R. Christie (2018). "Repeated mild traumatic brain injury can cause acute neurologic impairment without overt structural damage in juvenile rats." PloS one **13**(5): e0197187.
- Mychasiuk, R., A. Farran, M. Angoa-Perez, D. Briggs, D. Kuhn and M. J. Esser (2014). "A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats." J Vis Exp(94).
- Ojo, J. O., B. Mouzon, M. Algamal, P. Leary, C. Lynch, L. Abdullah, J. Evans, M. Mullan, C. Bachmeier, W. Stewart and F. Crawford (2016). "Chronic Repetitive Mild Traumatic Brain Injury Results in Reduced Cerebral Blood Flow, Axonal Injury, Gliosis, and Increased T-Tau and Tau Oligomers." J Neuropathol Exp Neurol **75**(7): 636-655.
- Omalu, B. I., J. Bailes, J. L. Hammers and R. P. Fitzsimmons (2010). "Chronic traumatic encephalopathy, suicides and parasuicides in professional American athletes: the role of the forensic pathologist." Am J Forensic Med Pathol **31**(2): 130-132.
- Organization, W. H. (2006). Neurological disorders: public health challenges, World Health Organization.
- Pedersen, B. K. (2000). "Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines." Immunol Cell Biol **78**(5): 532-535.

- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Prince, C. and M. E. Bruhns (2017). "Evaluation and Treatment of Mild Traumatic Brain Injury: The Role of Neuropsychology." *Brain Sci* **7**(8).
- Sanz, O., L. Acarin, B. Gonzalez and B. Castellano (2002). "NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain." *J Neurosci Res* **67**(6): 772-780.
- Semple, B. D., J. Carlson and L. J. Noble-Haeusslein (2016). "Pediatric Rodent Models of Traumatic Brain Injury." *Methods Mol Biol* **1462**: 325-343.
- Shlosberg, D., M. Benifla, D. Kaufer and A. Friedman "Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury." *Nat Rev Neurol* **6**(7): 393-403.
- Shlosberg, D., M. Benifla, D. Kaufer and A. Friedman (2010). "Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury." *Nat Rev Neurol* **6**(7): 393-403.
- Shrey, D. W., G. S. Griesbach and C. C. Giza (2011). "The pathophysiology of concussions in youth." *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics* **22**(4): 577-602.
- Taylor, C. A., J. M. Bell, M. J. Breiding and L. Xu (2017). "Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013." *MMWR Surveill Summ* **66**(9): 1-16.
- Truettner, J. S., H. M. Bramlett and W. D. Dietrich (2018). "Hyperthermia and mild traumatic brain injury: effects on inflammation and the cerebral vasculature." *Journal of neurotrauma* **35**(7): 940-952.
- Unterberg, A. W., R. Stroop, U. W. Thomale, K. L. Kiening, S. Pauser and W. Vollmann (1997). "Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats." *Acta Neurochir Suppl* **70**: 106-108.
- Walsh, R. N. and R. A. Cummins (1976). "The Open-Field Test: a critical review." *Psychol Bull* **83**(3): 482-504.
- Weaver, J., M. Lucero, M. Hewett, J. Kersey, K. Esmaili and S. Wheeler (2015). "Functional Rehabilitation Following TBI: An Analysis of Inpatient Recovery and Community Integration." *American Journal of Occupational Therapy* **69**(Supplement_1): 6911500005p6911500001-6911500005p6911500001.
- Yacoubian, T. A. and D. C. Lo (2000). "Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth." *Nat Neurosci* **3**(4): 342-349.
- Yu, C.-H., J.-Y. Yhee, J.-H. Kim, K.-S. Im, N.-H. Kim, D.-I. Jung, H.-C. Lee, S.-K. Chon and J.-H. Sur (2011). "Pro-and anti-inflammatory cytokine expression and histopathological characteristics in canine brain with traumatic brain injury." *Journal of veterinary science* **12**(3): 299-301.
- Zhao, X., B. Bausano, B. R. Pike, J. K. Newcomb-Fernandez, K. K. Wang, E. Shohami, N. C. Ringger, S. M. DeFord, D. K. Anderson and R. L. Hayes (2001). "TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures." *J Neurosci Res* **64**(2): 121-131.

Supplementary data

Figure 11. Monitoring food and water consumption about fifty days. The two-way ANOVA showed that have interaction ($F(1, 45) = 6,14$ $P=0,0170$) for concussion exercise \times sedentary concussion ($p < 0,0034$). To complete this date, the food consumption was measured and again the ANOVA ($F(1,44)= 21,74P < 0,0001$) showed differences between concussion exercise \times sedentary concussion ($p < 0,0028$), concussion exercise \times sedentary control ($p < 0,0001$) and control exercise \times sedentary control ($p < 0,0314$).

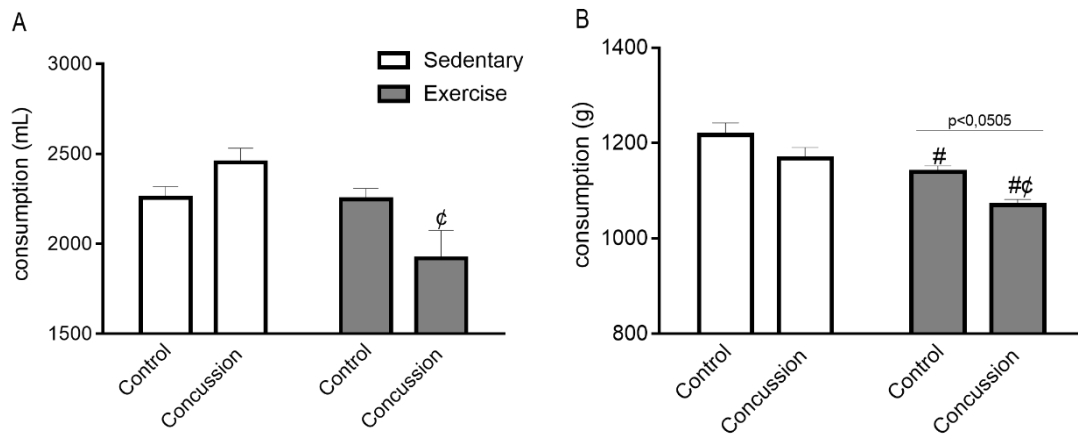


Figure 11. Effect of physical exercise and concussion on water (a) and food consumption (b) along fifty days. Values are expressed as the mean \pm SEM for nine animals per group. ϕ = difference the group \times sedentary concussion. # = difference between group \times sedentary control. $p < 0.05$ were considered significant (two-way ANOVA Tukey's posthoc).

Figure 12. Monitoring of weight gain of rats along protocol. Representative lines to exhibit visually the weight of animals. The representative unconsciousness time after recurrent concussion for all concussion's day.

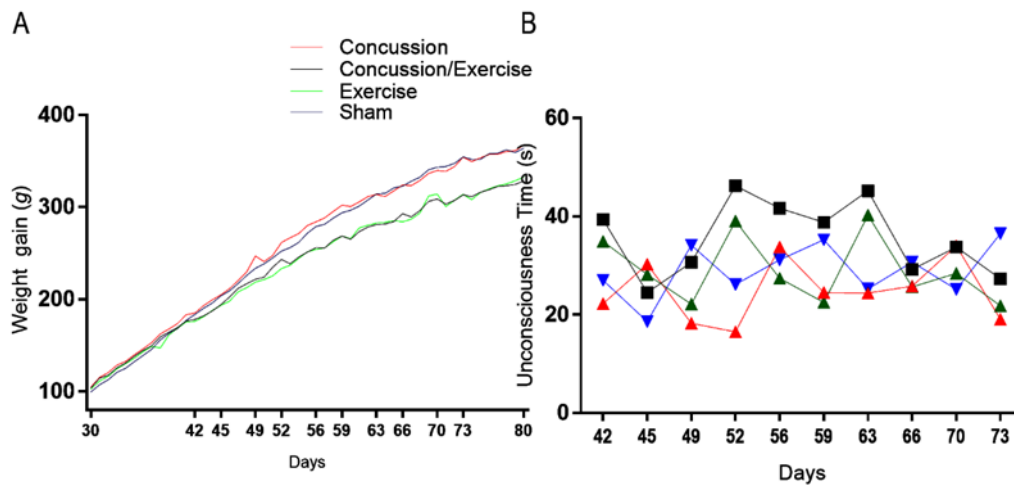


Figure 12. The representative weight gain (a) and the representative unconsciousness time (b). No statistical were made, only visual demonstrative.

5 DISCUSSÃO

A concussão afeta quase quatro milhões de atletas anualmente, sendo que este número pode ser até 3 vezes maior devido a subnotificação, sendo que muitos dos acometidos estão na fase da adolescência. Devido ao crescente estímulo a prática de esportes de contato, tem-se aumentado o número de jovens que sofrem com sintomas da concussão, dentre estes sintomas se encontram principalmente a cefaleia pós-concussão e o declínio cognitivo. Estudos tem mostrado que muitos dos alunos de ensino médio que praticam NFL exibem mudança comportamental após sua prática (CASTILE et al., 2012). Bem como sequelas mais graves são vistas em jovens que são levados aos centros de atendimentos e acabam indo a óbito devido a somatória das concussões (TAGGE et al., 2018). Dentre as principais mudanças comportamentais, salienta-se a perda de memória, que é disparado o sintoma mais perceptível da concussão.

Desta forma, mudanças comportamentais a curto ou longo prazo sempre são seguidas por alguma alteração cognitiva, principalmente associada com piora na memória. Estas alterações estão intimamente ligadas à mudanças no comportamento social, podendo estar relacionadas com o desenvolvimento de outras demências decorrentes das concussões como a ETC (OMALU et al., 2010). Uma das principais causas das concussões recorrentes é o desenvolvimento da ETC, que pode ser agravada principalmente por processos inflamatórios que contribuem para o declínio cognitivo, similar ao que ocorre à Doença de Alzheimer (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Lembrando que a decorrência de um dano ao encéfalo saudável induz o desenvolvimento de processos inflamatórios a este tecido, um processo comumente encontrado em atletas que praticam esportes de contato (OMALU et al., 2010).

Atualmente, dentre as várias modalidades esportivas disponíveis, a prática de esportes de contato, tais como NFL, rugby e MMA tem crescido constantemente, além daqueles esportes mais tradicionais como o futebol, onde a prática é constante. Normalmente, estes esportes são atribuídos a situações de alto esforço físico, o qual por sua vez, na fase de alta intensidade é conhecido por liberar mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (AVLONITI et al., 2017; OSTROWSKI et al., 1999). Na fase crônica, o exercício físico é conhecido por ativar vias que envolvem desde a sobrevivência neuronal até seu papel antioxidante em regiões do encéfalo (DA SILVA

FIORIN et al., 2016). No entanto, esportes de contato, podem provocar um efeito contrário por exigirem alta intensidade de força em situações decisivas, que normalmente são seguidas por choque corporal entre os jogadores acarretando em lesões do encéfalo por contato ou pelo movimento de aceleração e desaceleração da cabeça (OMALU et al., 2010). No momento em que há a concussão, mediadores inflamatórios são liberados, mas normalmente diminuem com o passar do tempo (CORPS et al., 2015). Entretanto, concussões recorrentes, seguidas por estímulos inflamatórios periféricos ou centrais, ocasionados pelo exercício podem vir a agravar o dano cerebral após a lesão. Dentro deste contexto, existe uma relação entre a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e o declínio cognitivo, principalmente depois de meses e anos após exposição crônica a eventos concussivos (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017).

Desta forma, alterações no padrão locomotor podem ser relacionadas com a gravidade das concussões recorrentes ou até mesmo TCE (FUJIMOTO et al., 2004). Nossos dados mostram que não há diferenças no número de cruzamentos e elevações no teste de campo aberto, demonstrando que nosso padrão de concussão não gera déficit motor ou exploratório, o que colabora com a literatura em padrões de concussão e TCE (GERBATIN et al., 2017; OJO et al., 2016). Estudos tem mostrado que animais submetidos a concussões recorrentes demonstram déficit motor, este por sua vez pode ser devido ao método utilizado para induzir a concussão ou até mesmo a relação entre o peso do animal e do pistão (MANNIX et al., 2014). Além disso, vinte e quatro horas após o teste de campo aberto, nós avaliamos a memória dos animais pelo teste de reconhecimento de objeto.

Nossos resultados mostram que os animais concussão de ambos os grupos não demonstraram déficit cognitivo na memória de localização, bem como na de curta duração. Entretanto, quando avaliada a memória de longa duração, os animais que foram forçados a praticar exercício e expostos a concussão demonstraram uma piora na memória em relação ao controle. Quando submetidos ao barnes maze, apenas os animais exercício controle diminuíram a latência e o número de erros para achar o buraco. Estes resultados nos mostram que os animais concussão exercício não apresentaram o mesmo padrão dos animais exercício controle. Nossos dados comportamentais mostram que há padrões comportamentais distintos de cada modelo de concussão utilizado pela literatura (FIDAN et al., 2016; KANE et al., 2012;

MYCHASIUK et al., 2016). Assim, foi observado que as mudanças comportamentais podem diferir entre os modelos de concussão recorrente, bem como a variabilidade da idade dos animais entre os trabalhos pode contribuir para esta variação de dados. Muitos modelos de concussão ou TCE em roedores jovens demonstram um padrão distinto, exibindo diferentes resultados com o mesmo modelo, variando apenas na idade dos animais (SEMPLE et al., 2013; SEMPLE et al., 2016). Desta forma, apenas o exercício físico somado com as concussões recorrentes exibe um perfil de piora na memória de longa duração dos animais.

Como dito acima, a piora da memória pode ser devido a processos inflamatórios que podem interferir nas vias de sinalização de proteínas responsáveis pela sua consolidação (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Estudos mostram que concussões recorrentes e TCE moderado apresentam o mesmo padrão de neuroinflamação (FADEN et al., 2016). A partir disto, nós avaliamos as principais proteínas pró-inflamatórias e apoptóticas no hipocampo (CORPS et al., 2015; SEMENZATO, 1990). Nossos dados mostram que os animais concussão sedentário aumentaram a expressão de mRNA de NFkB, IL-1 β e da Casp3, enquanto, a expressão de mRNA de TNF- α está elevada no grupo concussão exercício. Estes dados mostram que o exercício físico não potencializou a expressão de genes inflamatórios ocasionado pela concussão, exceto em TNF- α . A ativação microglial é conhecida como primeira linha de defesa do encéfalo, ela é considerada o macrófago do SNC (WOLF et al., 2017). Nossos resultados mostram que o grupo concussão exercício está com a micróglia ativada quando comparado ao concussão sedentário. Os astrócitos além de nutrir os neurônios, também são conhecidos por liberar alguns mediadores inflamatórios (MINAGAR et al., 2002), entretanto nenhuma diferença estatística foi vista entre os grupos. No entanto, estudos que utilizaram o mesmo modelo de indução da concussão recorrente, com variáveis diferentes, mostram que há astrogliosis no córtex e hipocampo (KANE et al., 2012). Por outro lado, a caspase-3, proteína relacionada com a apoptose celular, demonstra estar aumentada no grupo concussão exercício quando comparada ao controle sedentário. Sendo assim, quando avaliado a quantidade de TNF- α , o grupo concussão exercício demonstra um aumento na quantidade desta citocina pró-inflamatória em relação ao grupo concussão sedentário. A concussão imediatamente após exercício físico neste protocolo demonstra um aumento da quantidade de proteínas inflamatórias e apoptóticas. Este

efeito pode ser devido ao estresse ocasionado pelo exercício físico, somado com o estresse cerebral efetuado pela concussão. Visto que, nosso trabalho submeteu os animais à concussão exatamente dois minutos após a retirada do exercício físico, os efeitos da intensidade física podem ter contribuído sobre o processo inflamatório nos animais concussão exercício (ABBASI et al., 2014; PACKER e HOFFMAN-GOETZ, 2015).

Os efeitos anti-inflamatórios do nAChR $\alpha 7$ são bem descritos na literatura (EGEA et al., 2015). Nossos resultados mostram que há uma diminuição na sua quantidade e expressão genica no grupo sedentário concussão em relação ao sedentário controle. Não houve diferença entre o grupo concussão exercício e o controle sedentário. Estes dados se assemelham com os resultados encontrados no mRNA NFkB, IL-1 β e casp3 deste estudo. No entanto, ao avaliar mRNA Nfe2l2, gene que transcreve Nrf2, nenhuma diferença foi encontrada. Por outro lado, a quantidade de proteína da SOD2, uma enzima antioxidante que é resultado indireto da expressão de Nfe2l2 houve uma diminuição na sua quantidade no grupo concussão exercício em relação ao grupo controle exercício. Este efeito pode ser devido a soma da concussão e exercício, o qual demonstra uma diminuição na proteína essencial para a diminuição de ROS. Dentro deste contexto, estudos mostram que a diminuição da SOD2 ocasionada pelo TCE aumenta ROS e contribui para a exacerbação do dano no encéfalo, podendo ter efeito sobre a memória (MASSAAD e KLANN, 2011; SHI et al., 2018). Portanto, sugerimos que as concussões imediatamente após o exercício físico, mostra maior diminuição no conteúdo de SOD2 quando comparados a animais submetidos a um treinamento prévio e depois induzidos ao TCE moderado (da Silva Fiorin et al., 2016)

O BDNF é uma neurotrofina essencial para sobrevivência e diferenciação neuronal, estando envolvida em processos de formação da memória (BEKINSCHTEIN et al., 2008). Desta forma, nossos resultados mostram que não há diferenças entre os grupos no mRNA de BDNF, mas quando mensurada sua quantidade, os níveis de mBDNF estão diminuídos no grupo concussão sedentário em relação ao controle exercício. O aumento de BDNF em praticantes de exercício físico já é bem descrito na literatura, mas nenhum efeito da soma entre concussão e exercício foi vista (YARROW et al., 2010). Portanto, este resultado pode ser de grande relevância para

o entendimento fisiológico da lesão por concussão associada ao exercício nos esportes de contato.

Quando o mRNA de Ntrk2 foi mensurado, diferenças são vistas nos animais concussão de ambos grupos, em relação ao controle sedentário. Todavia, ao analisar a quantidade de proteína do TrkB, nenhuma diferença estatística foi encontrada. Este efeito pode ser relacionado com a forma truncada de TrkB, avaliada neste trabalho e o Ntrk2 transcrever genes para ambas formas de TrkB (truncada (~90kDa) e a de comprimento total (~140kDa)) (YACOUBIAN e LO, 2000). Por fim, ao avaliarmos o mRNA de CREB1, sua expressão é aumentada em ambos grupos concussão em relação ao sedentário controle, contudo na quantidade da proteína fosfo-CREB apenas houve diferença entre os grupos concussão em relação ao grupo controle exercício. Este dado nos mostra que o exercício físico aumentou a quantidade de fosfo-CREB, porém o grupo concussão exercício não aumentou.

6 CONCLUSÃO

A concussão não exhibe alteração comportamental, mas aumenta a expressão de proteínas inflamatórias e essa alteração no processo inflamatório, contribui para que o tecido se torne mais suscetível ao estresse ocasionado pelo exercício físico. Este processo foi demonstrado em nosso trabalho pelo aumento de proteínas inflamatórias e apoptóticas, bem como pela diminuição de proteínas relacionadas a memória e conseqüentemente déficit cognitivo em animais treinados que sofreram concussão.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A. et al. Exhaustive exercise modifies different gene expression profiles and pathways in LPS-stimulated and un-stimulated whole blood cultures. **Brain Behav Immun**, v. 39, p. 130-41, Jul 2014.

ABREU, C. C. et al. Does resistance exercise performed during dialysis modulate Nrf2 and NF-kappaB in patients with chronic kidney disease? **Life Sci**, v. 188, p. 192-197, Nov 1 2017.

AGUIAR, A. S., JR. et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mech Ageing Dev**, v. 132, n. 11-12, p. 560-7, Nov-Dec 2011.

ALLOWAY, T. P. et al. The cognitive and behavioral characteristics of children with low working memory. **Child Dev**, v. 80, n. 2, p. 606-21, Mar-Apr 2009.

AOI, W. et al. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. **Life Sci**, v. 75, n. 26, p. 3117-28, Nov 12 2004.

AVLONITI, A. et al. Exercise-Induced Oxidative Stress Responses in the Pediatric Population. **Antioxidants (Basel)**, v. 6, n. 1, Jan 17 2017.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 93, n. 1, p. 74-104, Feb 1979.

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

BASKAYA, M. K. et al. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. **Neurosci Lett**, v. 226, n. 1, p. 33-6, Apr 18 1997.

BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 147-56, Apr 2008.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth Factors**, v. 22, n. 3, p. 123-31, Sep 2004.

BITTIGAU, P. et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. **Ann Neurol**, v. 45, n. 6, p. 724-35, Jun 1999.

CANDY, S. et al. Staying in the game: a pilot study examining the efficacy of protective headgear in an animal model of mild traumatic brain injury (mTBI). **Brain Inj**, v. 31, n. 11, p. 1521-1529, 2017.

CANTU, R. C. Return to play guidelines after a head injury. **Clin Sports Med**, v. 17, n. 1, p. 45-60, Jan 1998.

CARDOSO, A. M. et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. **Cell Biochem Funct**, v. 31, n. 2, p. 136-51, Mar 2013.

CASTILE, L. et al. The epidemiology of new versus recurrent sports concussions among high school athletes, 2005-2010. **Br J Sports Med**, v. 46, n. 8, p. 603-10, Jun 2012.

COELHO, F. G. et al. Acute aerobic exercise increases brain-derived neurotrophic factor levels in elderly with Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 39, n. 2, p. 401-8, 2014.

COLLINS-PRAINO, L. E.; CORRIGAN, F. Does neuroinflammation drive the relationship between tau hyperphosphorylation and dementia development following traumatic brain injury? **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 369-382, Feb 2017.

CONTROL, C. F. D.; PREVENTION. National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on mild traumatic brain injury in the United States: steps to prevent a serious public health problem. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2003.

CORDIGLIERI, C.; FARINA, C. Astrocytes exert and control immune responses in the brain. **Current Immunology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 150-159, 2010.

CORPS, K. N. et al. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. **JAMA Neurol**, v. 72, n. 3, p. 355-62, Mar 2015.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Prog Brain Res**, v. 169, p. 323-38, 2008.

CULLINAN, S. B. et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 19, p. 8477-86, Oct 2004.

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

DALGARD, C. L. et al. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, p. 6, 2012.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 1, p. a020412, Jan 5 2015.

DASH, P. K. et al. Activation of Alpha 7 Cholinergic Nicotinic Receptors Reduce Blood-Brain Barrier Permeability following Experimental Traumatic Brain Injury. **J Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 2809-18, Mar 2 2016.

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

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

DE LIMA, M. N. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 6, p. 506-11, Jun 2005.

DISHMAN, R. K. et al. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DONE, A. J.; TRAUSTADOTTIR, T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. **Redox Biol**, v. 10, p. 191-199, Dec 2016.

DUHAIME, A. C. et al. Maturation-dependent response of the piglet brain to scaled cortical impact. **J Neurosurg**, v. 93, n. 3, p. 455-62, Sep 2000.

EGEA, J. et al. Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. **Biochem Pharmacol**, v. 97, n. 4, p. 463-472, Oct 15 2015.

ELOIA, S. C. et al. Análise epidemiológica das hospitalizações por trauma cranioencefálico em um hospital de ensino. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 10, n. 2, 2011.

EWING-COBBS, L. et al. Arrested development and disrupted callosal microstructure following pediatric traumatic brain injury: relation to neurobehavioral outcomes. **Neuroimage**, v. 42, n. 4, p. 1305-15, Oct 1 2008.

FADEN, A. I. et al. Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 4, p. 681-91, Feb 2016.

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

FERNANDES, R. N. R.; SILVA, M. Epidemiology of traumatic brain injury in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery**, v. 32, n. 03, p. 136-142, 2013.

FIDAN, E. et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in the Developing Brain: Effects on Long-Term Functional Outcome and Neuropathology. **J Neurotrauma**, v. 33, n. 7, p. 641-51, Apr 1 2016.

FLYNN, F. G. Memory impairment after mild traumatic brain injury. **Continuum (Minneap Minn)**, v. 16, n. 6 Traumatic Brain Injury, p. 79-109, Dec 2010.

FOLTRAN, R. B.; DIAZ, S. L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? **J Neurochem**, v. 138, n. 2, p. 204-21, Jul 2016.

FOSTER, T. C. et al. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. **Front Aging Neurosci**, v. 4, p. 12, 2012.

FUJIMOTO, S. T. et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-78, Jul 2004.

FUNCK, V. R. et al. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 10, p. 1705-10, Dec 2014.

GARDNER, A. et al. Chronic traumatic encephalopathy in sport: a systematic review. **Br J Sports Med**, v. 48, n. 2, p. 84-90, Jan 2014.

GARDNER, R. C.; YAFFE, K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. **Mol Cell Neurosci**, v. 66, n. Pt B, p. 75-80, May 2015.

GERBATIN, R. D. R. et al. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 10, p. 7585-7596, Dec 2017.

GIEDD, J. N. et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 861-3, Oct 1999.

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

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1387-94, Nov 2007.

HAY, J. R. et al. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 74, n. 12, p. 1147-57, Dec 2015.

HAYES, J. D. et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 11, p. 1713-48, Dec 1 2010.

HERCULANO-HOUZEL, S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. **Glia**, v. 62, n. 9, p. 1377-91, Sep 2014.

HOBBS, J. G. et al. Sports-related concussions: diagnosis, complications, and current management strategies. **Neurosurg Focus**, v. 40, n. 4, p. E5, Apr 2016.

HOLMIN, S. et al. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. **J Neurosurg**, v. 86, n. 3, p. 493-504, Mar 1997a.

HOLMIN, S. et al. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. **Journal of neurosurgery**, v. 86, n. 3, p. 493-504, 1997b.

IBRAHIM ABDEL FATTAH, L. et al. The Effect of Thymoquinone, alpha7 Receptor Agonist and alpha7 Receptor Allosteric Modulator on the Cerebral Cortex in Experimentally Induced Alzheimer's Disease in Relation to MSCs Activation. **Int J Stem Cells**, v. 9, n. 2, p. 230-238, Nov 30 2016.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997.

JIN, W. et al. Role of Nrf2 in protection against traumatic brain injury in mice. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 1, p. 131-9, Jan 2009.

KANDEL, E. R. et al. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163-86, Mar 27 2014.

KANE, M. J. et al. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. **J Neurosci Methods**, v. 203, n. 1, p. 41-9, Jan 15 2012.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, n. 3, p. 381-91, Jun 2000.

KARJALAINEN, J. J. et al. Effects of physical activity and exercise training on cardiovascular risk in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 4, p. 706-15, Apr 2015.

KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 942-52, Jul 2015.

KHOROOSHI, R. et al. NF-kappaB-driven STAT2 and CCL2 expression in astrocytes in response to brain injury. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 7284-91, Nov 15 2008.

KILBAUGH, T. J. et al. Mitochondrial bioenergetic alterations after focal traumatic brain injury in the immature brain. **Exp Neurol**, v. 271, p. 136-44, Sep 2015.

KOMATSU, M. et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 213-23, Mar 2010.

KOWIANSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cell Mol Neurobiol**, v. 38, n. 3, p. 579-593, Apr 2018.

KWAK, M. K. et al. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 23, p. 8786-94, Dec 2003.

LEAL, G. et al. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm**, v. 104, p. 153-195, 2017.

LENT, D. D.; KWON, H. W. Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach *Periplaneta americana*. **J Exp Biol**, v. 207, n. Pt 2, p. 369-75, Jan 2004.

LENZLINGER, P. M. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 73-9, 2004.

LIMA, F. D. et al. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 1279, p. 147-55, Jul 7 2009.

LING, H. et al. Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. **Mol Cell Neurosci**, v. 66, n. Pt B, p. 114-22, May 2015.

LONGHI, L. et al. Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury. **Neurosurgery**, v. 56, n. 2, p. 364-374, 2005.

LOVELL, M. R.; COLLINS, M. W. Neuropsychological assessment of the college football player. **The Journal of head trauma rehabilitation**, v. 13, n. 2, p. 9-26, 1998.

LUERSSSEN, T. G.; KLAUBER, M. R. Outcome from pediatric head injury: on the nature of prospective and retrospective studies. 1989. **Pediatr Neurosurg**, v. 23, n. 1, p. 34-40; discussion 41, 1995.

LUO, Y. et al. Mild traumatic brain injury induces memory deficits with alteration of gene expression profile. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 10846, Sep 7 2017.

MAGALHÃES, A. L. G. et al. Epidemiologia do traumatismo cranioencefálico no Brasil. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 53, n. 2, 2017.

MANNIX, R. et al. Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. **J Neurosurg**, v. 121, n. 6, p. 1342-50, Dec 2014.

MANNIX, R. et al. Adolescent Mice Demonstrate a Distinct Pattern of Injury after Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**, v. 34, n. 2, p. 495-504, Jan 15 2017.

MARILIA SILVA, A. et al. - Treadmill Exercise Improved Memory Evocation and Upregulated Alpha7 Nicotinic Receptors Density in Lower Cognitive Performance Rats. v. - 2, n. - 1, p. - 6, 2016.

MASSAAD, C. A.; KLANN, E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 10, p. 2013-54, May 15 2011.

MCCRORY, P. et al. Consensus statement on Concussion in Sport - The 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. **Phys Ther Sport**, v. 14, n. 2, p. e1-e13, May 2013a.

MCCRORY, P. et al. Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. **Br J Sports Med**, v. 47, n. 5, p. 250-8, Apr 2013b.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 14 2000.

MCKEE, A. C. et al. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. **Brain**, v. 136, n. 1, p. 43-64, 2013.

MECONI, A. et al. Repeated mild traumatic brain injury can cause acute neurologic impairment without overt structural damage in juvenile rats. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197187, 2018.

MEEHAN, W. P., 3RD; MANNIX, R. Pediatric concussions in United States emergency departments in the years 2002 to 2006. **J Pediatr**, v. 157, n. 6, p. 889-93, Dec 2010.

MEEUSEN, R. Exercise, nutrition and the brain. **Sports Med**, v. 44 Suppl 1, p. S47-56, May 2014.

MELO, J. R. T. et al. Características dos pacientes com trauma cranioencefálico na cidade do Salvador, Bahia, Brasil. 2004.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 11, p. 1637-40, Nov 2010.

MILLER, G. et al. Plans and the structure of behaviour. New York, New York: Holt, Rinehart and Winston: Inc 1960.

MINAGAR, A. et al. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 202, n. 1-2, p. 13-23, Oct 15 2002.

MINEN, M. T. et al. Post-Concussive Syndrome: a Focus on Post-Traumatic Headache and Related Cognitive, Psychiatric, and Sleep Issues. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 16, n. 11, p. 100, Nov 2016.

MYCHASIUK, R. et al. A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats. **J Vis Exp**, n. 94, Dec 8 2014.

MYCHASIUK, R. et al. Reducing the time interval between concussion and voluntary exercise restores motor impairment, short-term memory, and alterations to gene expression. **Eur J Neurosci**, v. 44, n. 7, p. 2407-2417, Oct 2016.

NAGAHARA, A. H.; TUSZYNSKI, M. H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 3, p. 209-19, Mar 2011.

NARASIMHAN, M.; RAJASEKARAN, N. S. Exercise, Nrf2 and Antioxidant Signaling in Cardiac Aging. **Front Physiol**, v. 7, p. 241, 2016.

NEEPER, S. A. et al. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 109, Jan 12 1995.

NISHIGUCHI, S. et al. A 12-Week Physical and Cognitive Exercise Program Can Improve Cognitive Function and Neural Efficiency in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized Controlled Trial. **J Am Geriatr Soc**, v. 63, n. 7, p. 1355-63, Jul 2015.

NOLAN, T.; PENNY, M. Epidemiology of non-intentional injuries in an Australian urban region: results from injury surveillance. **Journal of paediatrics and child health**, v. 28, n. 1, p. 27-35, 1992.

OJO, J. O. et al. Chronic Repetitive Mild Traumatic Brain Injury Results in Reduced Cerebral Blood Flow, Axonal Injury, Gliosis, and Increased T-Tau and Tau Oligomers. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 75, n. 7, p. 636-55, Jul 2016.

OMALU, B. I. et al. Chronic traumatic encephalopathy, suicides and parasuicides in professional American athletes: the role of the forensic pathologist. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 31, n. 2, p. 130-2, Jun 2010.

ORGANIZATION, W. H. **Neurological disorders: public health challenges**. World Health Organization, 2006. ISBN 9241563362.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, Feb 15 1999.

PACKER, N.; HOFFMAN-GOETZ, L. Acute exercise increases hippocampal TNF-alpha, Caspase-3 and Caspase-7 expression in healthy young and older mice. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 55, n. 4, p. 368-76, Apr 2015.

PAILLARD, T. et al. Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. **J Clin Neurol**, v. 11, n. 3, p. 212-9, Jul 2015.

PARADA, E. et al. The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 11, p. 1135-48, Oct 10 2013.

PARRINI, M. et al. Aerobic exercise and a BDNF-mimetic therapy rescue learning and memory in a mouse model of Down syndrome. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 16825, Dec 4 2017.

PEDERSEN, B. K. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. **Immunol Cell Biol**, v. 78, n. 5, p. 532-5, Oct 2000.

PERGHER, G. K. et al. Memory, mood and emotion. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 28, n. 1, p. 61-68, 2006.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PIN-BARRE, C.; LAURIN, J. Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. **Neural Plast**, v. 2015, p. 608581, 2015.

PINHEIRO, N. M. et al. Acute lung injury is reduced by the alpha7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. **FASEB J**, v. 31, n. 1, p. 320-332, Jan 2017.

PRINCE, C.; BRUHNS, M. E. Evaluation and Treatment of Mild Traumatic Brain Injury: The Role of Neuropsychology. **Brain Sci**, v. 7, n. 8, Aug 17 2017.

QIAN, Y. et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. **Nat Immunol**, v. 8, n. 3, p. 247-56, Mar 2007.

RADA, P. et al. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 6, p. 1121-33, Mar 2011.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, Sep 29 2006.

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

SANDBERG, M. et al. NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 298-306, Apr 2014.

SANTOS, F. D. et al. Traumatismo cranioencefálico: causas e perfil das vítimas atendidas no pronto-socorro de Pelotas/Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 882-893, 2013.

SANZ, O. et al. NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain. **J Neurosci Res**, v. 67, n. 6, p. 772-80, Mar 15 2002.

SCHNEIDER, K. J. et al. The effects of rest and treatment following sport-related concussion: a systematic review of the literature. **Br J Sports Med**, v. 47, n. 5, p. 304-7, Apr 2013.

SEMENZATO, G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. **Br J Cancer**, v. 61, n. 3, p. 354-61, Mar 1990.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, v. 106-107, p. 1-16, Jul-Aug 2013.

SEMPLE, B. D. et al. Pediatric Rodent Models of Traumatic Brain Injury. **Methods Mol Biol**, v. 1462, p. 325-43, 2016.

SHI, X. et al. Effects of over-expression of SOD2 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells on traumatic brain injury. **Cell Tissue Res**, v. 372, n. 1, p. 67-75, Apr 2018.

SHLOSBERG, D. et al. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 7, p. 393-403, Jul 2010.

_____. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 7, p. 393-403, Jul 2010.

SHRAGER, Y. et al. Spatial memory and the human hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 8, p. 2961-6, Feb 20 2007.

SHREY, D. W. et al. The pathophysiology of concussions in youth. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, v. 22, n. 4, p. 577-602, 2011.

SILVA, L. F. et al. Treadmill exercise protects against pentylentetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 30, n. 14, p. 1278-87, Jul 15 2013.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 12, p. 638-47, Dec 2009.

SOUZA, M. A. et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 811-23, Apr 2009.

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 5, n. 1, p. 37-53, Jan-Feb 2013.

SUZUKI, A. et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **J Neurosci**, v. 31, n. 24, p. 8786-802, Jun 15 2011.

TAGGE, C. A. et al. Concussion, microvascular injury, and early tauopathy in young athletes after impact head injury and an impact concussion mouse model. **Brain**, v. 141, n. 2, p. 422-458, Feb 1 2018.

TASKER, R. C. Changes in white matter late after severe traumatic brain injury in childhood. **Dev Neurosci**, v. 28, n. 4-5, p. 302-8, 2006.

TAYLOR, C. A. et al. Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013. **MMWR Surveill Summ**, v. 66, n. 9, p. 1-16, Mar 17 2017.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-4, Jul 13 1974.

TRUETTNER, J. S. et al. Hyperthermia and Mild Traumatic Brain Injury: Effects on Inflammation and the Cerebral Vasculature. **J Neurotrauma**, Feb 9 2018a.

TRUETTNER, J. S. et al. Hyperthermia and mild traumatic brain injury: effects on inflammation and the cerebral vasculature. **Journal of neurotrauma**, v. 35, n. 7, p. 940-952, 2018b.

TSOU, Y. H. et al. Treadmill exercise activates Nrf2 antioxidant system to protect the nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP⁺ toxicity. **Exp Neurol**, v. 263, p. 50-62, Jan 2015.

UNTERBERG, A. W. et al. Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. **Acta Neurochir Suppl**, v. 70, p. 106-8, 1997.

WALSH, J. J.; TSCHAKOVSKY, M. E. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions. **Appl Physiol Nutr Metab**, May 18 2018.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, May 1976.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-8, Jan 23 2003.

WEAVER, J. et al. Functional Rehabilitation Following TBI: An Analysis of Inpatient Recovery and Community Integration. **American Journal of Occupational Therapy**, v. 69, n. Supplement_1, p. 6911500005p1-6911500005p1, 2015.

WOLF, S. A. et al. Microglia in Physiology and Disease. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 619-643, Feb 10 2017.

YACOUBIAN, T. A.; LO, D. C. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 4, p. 342-9, Apr 2000.

YARROW, J. F. et al. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). **Neurosci Lett**, v. 479, n. 2, p. 161-5, Jul 26 2010.

YU, C.-H. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokine expression and histopathological characteristics in canine brain with traumatic brain injury. **Journal of veterinary science**, v. 12, n. 3, p. 299-301, 2011.

ZHANG, A. L. et al. The Rise of Concussions in the Adolescent Population. **Orthop J Sports Med**, v. 4, n. 8, p. 2325967116662458, Aug 2016.

ZHAO, X. et al. TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. **J Neurosci Res**, v. 64, n. 2, p. 121-31, Apr 15 2001.

ZUCHERO, J. B.; BARRES, B. A. Glia in mammalian development and disease. **Development**, v. 142, n. 22, p. 3805-9, Nov 15 2015.