

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

**Douglas Buchmann Godinho**

**O EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS A PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA COMUNICAÇÃO ENTRE CÉREBRO, BAÇO E INTESTINO DE RATOS**

Santa Maria, RS

2021



**Douglas Buchmann Godinho**

**O EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS A PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA COMUNICAÇÃO ENTRE CÉREBRO, BAÇO E INTESTINO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2021

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

Godinho, Douglas Buchmann

O EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS A PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA COMUNICAÇÃO ENTRE CÉREBRO, BAÇO E INTESTINO DE RATOS / Douglas Buchmann Godinho.- 2021.

153 p.; 30 cm

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2021

1. Concussão 2. Eixo Cérebro-Intestino 3. Inflamação  
4. Esportes I. Royes, Luiz Fernando Freire II. Título.

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

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

**Douglas Buchmann Godinho**

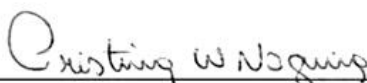
**O EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS A PRÁTICA  
DE EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA COMUNICAÇÃO ENTRE  
CÉREBRO, BAÇO E INTESTINO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 30 de Agosto de 2021:



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



Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM) - Videoconferência



Documento assinado digitalmente

Juliano Ferreira

Data: 24/09/2021 09:57:13-0300

CPF: 018.487.089-55

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Juliano Ferreira, Dr. (UFSC) – Videoconferência

**Santa Maria, RS**

**2021**



## AGRADECIMENTOS

Na manhã de 21 de dezembro de 2015, quando eu bati na porta da sala nº 5219 do prédio 21 da UFSM (depois de ter esperado mais de uma hora sentado na frente da sala errada) e perguntei se tinha “um pessoal da Educação Física” ali, eu não fazia ideia de tudo o que eu ia viver e do quanto eu ia mudar nesses quase 6 anos de BioEx. E eu não poderia ser mais grato a tudo que aconteceu. Se eu voltasse para aquele dia, com meus 18 anos (sem barba, com 20 quilos a menos, mas com muito cabelo a mais), eu bateria na porta de novo.

Fiz o que eu queria fazer, o que eu amava fazer. Acordar as 5 horas da manhã de domingo no inverno e pegar dois ônibus pra atravessar os 20km que me separavam da UFSM nunca foi difícil, porque eu sabia que ia encontrar e passar o dia com meus melhores amigos, fazendo o que a gente gosta de fazer. Sabia que iríamos tomar um mate ou um café na arquibancada do estádio, vendo o sol nascer e falando tudo sobre o nada. Que íamos fazer o nosso trabalho em equipe do jeito mais certo possível. Sabia que ia ter a pausa pro almoço, a pausa pro café. Que no fim do dia a gente ia apagar as luzes do CEFD, ligar o alarme e sair do prédio, de frente pro pôr do sol na UFSM (na maioria das vezes já não tinha mais sol mesmo). E sabia que ia ter tudo isso de novo no dia seguinte.

Eu não sei colocar em palavras o quanto eu sou grato a tudo o que vivi nesse tempo. O quanto foi bom conhecer tantas pessoas incríveis nesse caminho. Ter as conversas mais idiotas e as mais profundas, que muitas vezes aconteciam em intervalos de minutos uma da outra. O quanto amo a UFSM e me sinto em casa andando pelos corredores do CEFD. O quanto foi bom correr no campus no fim da tarde, falando sobre os planos pra vida. Almoçar e jantar no RU ou na sala de estudos com toda a família BioEx. Errar e fazer mil vezes de novo os experimentos. Sair com a gurizada pro Kioski, Locadora, Container ou pra algum churras...

Não existe nada de arrependimento nesses anos de BioEx. Cresci e dei meus primeiros passos da vida adulta nesse tempo. Foram anos significativos da minha vida, que me ajudaram a amadurecer, assumir responsabilidades e a me tornar quem eu sou.

Portanto, obrigado a todos que estiveram junto comigo nessa caminhada!





Somos assim: sonhamos o vôo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o vôo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Mas é isso que tememos: o não ter certezas. Por isso trocamos o vôo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.

(Rubem Alves)



## RESUMO

### **O EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS A PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA COMUNICAÇÃO ENTRE CÉREBRO, BAÇO E INTESTINO DE RATOS**

AUTOR: Douglas Buchmann Godinho

ORIENTADOR: Dr. Luiz Fernando Freire Royes

O Traumatismo Cranioencefálico (TCE) é definido como uma alteração na função cerebral ocasionada por uma força externa ao encéfalo, sendo que de 80 a 90% dos casos são de TCE leve ou concussão. Quanto ao mecanismo de dano do TCE, ele é dividido em dano primário, que é o momento do insulto mecânico no encéfalo e dano secundário, que são as consequências bioquímicas do primeiro dano. Recentemente, o papel que órgãos periféricos desempenham na progressão do dano secundário a nível de sistema nervoso central tem sido foco de pesquisa no mundo todo, entretanto ainda não é estabelecida uma forma pela qual diferentes órgãos periféricos se comunicam na fisiopatologia do TCE. No ambiente esportivo as concussões recorrentes (CR), especialmente em esportes de contato, não chegam a ser novidade. A preocupação reside na sua reincidência, que deixa o cérebro vulnerável a danos que levam a alterações cognitivas significativas. Embora as atenções estejam voltadas ao funcionamento do cérebro, ainda são insipientes estudos que avaliem a janela de vulnerabilidade de CR em órgãos periféricos. Assim, o trabalho objetiva revisar e investigar os efeitos do TCE e de CR associadas à prática de exercício físico no intestino, baço e córtex cerebral de ratos. Para tal, além de uma revisão de literatura acerca do tema, ratos Wistar machos com 30 dias de vida, serão divididos em 4 grupos (Controle Sedentário, Concussão Sedentário, Controle Exercício e Exercício Concussão), submetidos a um protocolo de natação de cinco semanas, onde duas vezes a cada semana sofrerão uma concussão pelo modelo de queda livre de peso (54g a 71cm), totalizando dez concussões. Sete dias após a última sessão de natação e concussão, os animais serão eutanasiados, o cólon proximal (CP) será utilizado para a análise do estado oxidativo, nitrosativo, inflamatório. Parâmetros relacionados ao sistema anti-inflamatório colinérgico foram avaliados tanto no baço quanto o CP, e a expressão de GFAP foi verificada no córtex cerebral. No CP, as CR induziram a lipoperoxidação, a diminuição da capacidade antioxidante e ao aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE), bem como da expressão do nAChR  $\alpha 7$ . Tais alterações não são induzidas por dano nitrosativo, visto que não houve alteração na expressão de iNOS e 3-NT. O protocolo de natação limitou as alterações induzidas pelas CR e se mostrou efetivo para aumentar a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase, assim como normalizou a atividade da AChE e induziu o aumento da expressão de 5HT4R. O aumento da expressão de Nrf2 no grupo Concussão exercício pode estar por trás da manutenção da capacidade antioxidante e da limitação da peroxidação lipídica nesse grupo. As alterações no CP se dão sem que ocorra astrogliose no córtex, e as alterações na expressão de nAChR  $\alpha 7$  e de Nrf2 vistas no CP não se repetem no baço, dissociando a resposta de diferentes órgãos frente ao protocolo de CR e de exercício. Concluímos que o protocolo de natação limita as alterações induzidas pelas CR, indicando uma diminuição na janela de tempo de vulnerabilidade, a nível intestinal, a uma segunda concussão.

**Palavras-chave:** Concussão. Eixo Cérebro-Intestino. Inflamação. Esportes.



## ABSTRACT

### THE EFFECT OF RECURRENT CONCUSSIONS ASSOCIATED WITH PHYSICAL SWIMMING EXERCISE ON THE BRAIN-SPLEEN-GUT AXIS OF RATS

AUTHOR: Douglas Buchmann Godinho  
ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes, PhD

Traumatic Brain Injury (TBI) is defined as an alteration in brain function caused by a force external to the brain, and 80 to 90% of cases are mild TBI or concussion. As for the TBI damage mechanism, it is divided into primary damage, which is the moment of mechanical insult to the brain, and secondary damage, which are the biochemical consequences of the first damage. Recently, the role that peripheral organs play in the progression of secondary damage in the central nervous system has been the focus of research worldwide, however, the way in which different peripheral organs communicate in the pathophysiology of TBI has not yet been established. In the sports environment, recurrent concussions (RC), especially in contact sports, are hardly new. The concern is its recurrence, which leaves the brain vulnerable to damage that leads to significant cognitive changes. Although attention is focused on the functioning of the brain, studies that assess the vulnerability window of RC in peripheral organs are still incipient. Thus, the work aims to review and investigate the effects of TBI and RC associated with the practice of physical exercise in the intestine, spleen and cerebral cortex of rats. To this end, in addition to a literature review on the subject, 30-day-old male Wistar rats will be divided into 4 groups (Sedentary Control, Sedentary Concussion, Exercise Control and Concussion Exercise), submitted to a five-week swimming protocol, where twice a week will suffer a concussion by the weight-drop model (54g to 71cm), totaling ten concussions. Seven days after the last swimming and concussion session, the animals will be euthanized, the proximal colon (PC) will be used for the analysis of the oxidative, nitrosative, inflammatory state. Parameters related to the cholinergic anti-inflammatory system were evaluated in both the spleen and the PC, and the expression of GFAP was verified in the cerebral cortex. In PC, RC induced lipoperoxidation, decreased antioxidant capacity and increased acetyl cholinesterase (AChE) activity, as well as  $\alpha 7$  nAChR expression. Such alterations are not induced by nitrosative damage, since there was no alteration in the expression of iNOS and 3-NT. The swimming protocol limited the changes induced by RC and proved to be effective in increasing the activity of the enzyme  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase, as well as normalizing the activity of AChE and induced increased expression of 5HT4R. The increased expression of Nrf2 in the Concussion exercise group may be behind the maintenance of the antioxidant capacity and the limitation of lipid peroxidation in this group. Changes in PC occur without astrogliosis in the cortex, and changes in the expression of nAChR $\alpha 7$  and Nrf2 seen in PC are not repeated in the spleen, dissociating the response of different organs to the RC and exercise protocol. We conclude that the swimming protocol limits the changes induced by RC, indicating a decrease in the time window of vulnerability, at the intestinal level, to a second concussion.

**Keywords:** Concussion. Brain-gutaxis. Inflammation. Sports.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tipos de lesões no TCE .....	25
Figura 2 - Modelos experimentais de TCE .....	27
Figura 3 - Modelos experimentais de TCE induzidos por WD .....	28
Figura 4 - Cascata de eventos bioquímicos no neurônio ocasionada por uma concussão .....	29
Figura 5 - A) Janela de vulnerabilidade a um segundo evento concussivo com período adequado de descanso .....	30
Figura 5 - B) Efeito somatório de um segundo TCE leve dentro da janela de vulnerabilidade do primeiro evento concussivo .....	31
Figura 6 – Homeostase do funcionamento intestinal .....	36
Figura 7 – Visão esquemática da anatomia do baço .....	39

### CAPÍTULO I

Figure 1 - The proposed mechanism that the spleen may cause a beneficial or harmful signaling pathway after TBI .....	89
Figure 2 - Possible mechanisms of connection between the brain-gut-spleen after TBI .....	90
Figure 3 - General body effects of physical exercise .....	91
Figure 4 - The beneficial effects of physical exercise on TBI treatment: proposed mechanisms of action through the brain-spleen-gut axis .....	92

### CAPÍTULO II

Figura 1 - Delineamento experimental .....	99
Figura 2 - Tempo de inconsciência dos animais, do momento em que ficam anestesiados até seu retorno à posição pronada .....	109

Figura 3 - Fotos demonstrativas do efeito de 10 concussões repetitivas no encéfalo de ratos .....	109
Figura 4 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico na lipoperoxidação (A), na Capacidade antioxidante total (B) e na atividade da enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase (C) no cólon proximal .....	110
Figura 5 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico em parâmetros do sistema colinérgico do cólon proximal .....	111
Figura 6 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico no estado nitrosativo intestinal .....	111
Figura 7 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico sobre parâmetros antioxidantes intestinais .....	112
Figura 8 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína AMPK (A) e do receptor 5-HT4 (B) no cólon proximal .....	113
Figura 9 - Influência de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Nrf2 (A) e do receptor nicotínico de acetilcolina Alfa 7 (nAChR $\alpha$ 7) (B) no baço .....	114
Figura 10 - Efeito de concussões recorrentes associadas à pratica de exercício físico sobre a expressão de GFAP em regiões superficiais do córtex cerebral .....	115



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Escala de Coma de Glasgow ( <a href="http://www.glasgowcomascale.org">http://www.glasgowcomascale.org</a> ) .....	24
Tabela 2 - Protocolo de exercício físico de natação .....	101
Tabela 3 - Lista de anticorpos utilizados no trabalho .....	104



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AML	Adaptação ao Meio Líquido
ARE	Elemento de Resposta antioxidante
BHE	Barreira Hematoencefálica
CCI	Impacto Cortical Controlado
CDC	Center for Disease Control
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
ECG	Escala de Coma de Glasgow
ETC	Encefalopatia Traumática Crônica
EUA	Estados Unidos da América
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IBD	Doenças Inflamatórias do Intestino (do inglês <i>Intestinal Bowel Disease</i> )
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LPF	Lesão por Percussão de Fluído
MDA	Malondialdeído
MLCK	Miosina Quinase de Cadeia Leve
nAChR $\alpha$ 7	Receptor nicotínico de acetilcolina do tipo alfa 7
NF $\kappa$ B	Fator Nuclear kappa B
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas ao Oxigênio
RL	Radical Livre
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo Cranioencefálico

TCEL	Traumatismo Cranioencefálico Leve
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral – Alfa
TLR	Toll Like Receptor
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
WD	Weight Drop (modelo experimental de indução de concussões por queda livre de peso)
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO .....	23
<b>2.1.1 Definição e quadro epidemiológico</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.2 Classificação do TCE</b> .....	<b>24</b>
2.2 CONCUSSÃO .....	26
<b>2.2.1 Mecanismos celulares de dano do evento concussivo</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.2 Concussões relacionadas a prática de esportes</b> .....	<b>29</b>
2.3 O EFEITO PERIFÉRICO DO TCE.....	32
<b>2.3.1 TCE e o eixo cérebro-intestino</b> .....	<b>32</b>
2.3.1.1 <i>O intestino</i> .....	34
2.3.1.2 <i>Estresse oxidativo e inflamação no intestino</i> .....	37
<b>2.3.2 TCE e o baço</b> .....	<b>39</b>
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO.....	41
<b>2.4.1 Exercício físico e o TCE</b> .....	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	45
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO DO CAPÍTULO I.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO II .....	45
<b>4 CAPÍTULO I</b> .....	<b>47</b>
<b>5 CAPÍTULO II</b> .....	<b>99</b>
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
<b>5.1.1 Animais</b> .....	<b>99</b>
<b>5.1.2 Delineamento experimental</b> .....	<b>99</b>
<b>5.1.3 Indução de concussão recorrente por queda de peso</b> .....	<b>100</b>
<b>5.1.4 Tempo de inconsciência</b> .....	<b>101</b>
<b>5.1.5 Protocolo de natação</b> .....	<b>101</b>
<b>5.1.6 Preparo do tecido para as análises bioquímicas</b> .....	<b>102</b>
<b>5.1.7 Determinação da atividade da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase</b> .....	<b>102</b>
<b>5.1.8 Atividade da enzima Acetilcolinesterase</b> .....	<b>102</b>
<b>5.1.9 Determinação dos níveis de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	<b>103</b>
<b>5.1.10 Capacidade Antioxidante Total (TAC)</b> .....	<b>103</b>

<b>5.1.11</b>	<b>Análise por Western Blot .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1.12</b>	<b>Determinação da concentração de proteína nas amostras.....</b>	<b>105</b>
<b>5.1.13</b>	<b>Imunohistoquímica.....</b>	<b>105</b>
<b>5.1.14</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>105</b>
<b>5.2</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>106</b>
<b>5.3</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>121</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Traumatismo Cranioencefálico (TCE), definido como uma alteração na função cerebral ocasionada pela aplicação de uma força externa ao encéfalo (MENON et al., 2010a), é um problema de saúde pública que afeta, anualmente, cerca de 69 milhões de pessoas em todo o mundo (DEWAN et al., 2018). O dano ocasionado pelo TCE é uma combinação do dano primário, que corresponde ao momento do dano mecânico no encéfalo, e as consequências bioquímicas e metabólicas desse evento, que são chamadas de dano secundário, desenvolvidas de segundos a até mesmo anos após o dano mecânico (BLENNOW et al., 2016). De acordo com indicadores clínicos, como a Escala de Coma de Glasgow (ECG), o TCE é classificado em severo, moderado e leve ou concussão, sendo os dois últimos termos equivalentes (BLENNOW et al., 2016).

A concussão, objeto de estudo do presente projeto, representa de 80% a 90% dos casos de TCE, mostrando grande incidência na população jovem (COBB et al., 2013; LI, MIN et al., 2016; MCCRORY et al., 2013; MUNCE et al., 2015). É pouco provável que uma única concussão resulte em efeitos adversos a longo prazo, porém, caso o corra repetidamente, o efeito-somatório dos danos secundários pode levar a uma resposta neuroinflamatória exacerbada, podendo se tornar até mesmo uma condição crônica, com efeitos semelhante são de um TCE moderado (BLENNOW et al., 2016). Sendo assim, é sugerido que devido a potencial evolução do dano secundário, a concussão deve ser tratada como uma doença em progresso, e não como um evento estático (MASEL; DEWITT, 2010).

Sabe-se hoje que o dano secundário do TCE não se limita apenas ao sistema nervoso central. Já é estabelecido, por exemplo, que um TCE pode causar danos ao coração, fígado, baço e ao trato gastrointestinal (TGI) (DE CASTRO et al., 2017a; KERR et al., 2018; KHARRAZIAN; DATIS, 2015b; VILLAPOL al., 2015b). Entre as disfunções intestinais observadas em vítimas de TCE, destaca-se a alteração da microbiota observada em vítimas de TCE até mesmo 20 anos após o dano primário (URBAN et al., 2020) e, em modelos experimentais, a lesão na mucosa e a quebra da barreira intestinal (JIN et al., 2008; JIN et al., 2009; KHARRAZIAN; DATIS, 2015b). Tais eventos podem ocasionar um quadro de endotoxemia e de inflamação sistêmica, podendo envolver outros órgãos na resposta ao dano secundário, como o baço (GODINHO et al., 2021).

Concussões durante atividades esportivas não são novidade, e possuem uma intrínseca relação com esportes de contato, acometendo cerca de 3,8 milhões de atletas por ano (HOBBS

et al., 2016). A preocupação reside na reincidência da lesão, uma vez que a ativação de vias inflamatórias durante a “janela de vulnerabilidade ao segundo impacto” (BLENNOW et al., 2016) pode ocasionar alterações celulares associadas a déficits cognitivos significativos (BARKHOUDARIAN, G. et al., 2016b; BLENNOW et al., 2016; MA et al., 2017a). Sabe-se que, de forma aguda, o exercício físico pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias sendo que, quanto mais intenso, maior é a liberação desses mediadores (CORMIE et al., 2016; OSTROWSKI et al., 1999; ROYES, 2020a). Já o aumento das defesas antioxidantes e anti-inflamatórias induzidas pelo treinamento físico constitui-se como uma adaptação metabólica capaz de proteger as células e tecidos do estresse oxidativo/inflamatório gerado pelo próprio exercício físico (BANERJEE, 2003). No contexto metabólico, vale destacar que os efeitos benéficos da prática de exercícios físicos já são bem descritos, tanto na modulação do sistema imune (BARNES, 2015; BINDER, E. et al., 2004; NEEPER et al., 1995), como em relação à uma modulação positiva da microbiota e funcionamento intestinal (CODELLA et al., 2018). No entanto, pouco se sabe acerca da interação da janela de vulnerabilidade das concussões recorrentes e o estresse agudo ocasionado pelo exercício físico.

Considerando que alterações no funcionamento de estruturas cerebrais influenciam no metabolismo órgãos periféricos tais como intestino e baço, faz-se necessário investigar se possíveis alterações no metabolismo periférico induzido pela somatória de concussões recorrentes associadas ao exercício físico podem influenciar na progressão do dano secundário cerebral. Tal entendimento acerca do tema pode ampliar os horizontes no campo da pesquisa acerca dos efeitos das concussões recorrentes na fisiologia geral, possibilitando novas formas de buscar tratamentos para o dano secundário, levando em conta não apenas o encéfalo quando se debate o tempo de retorno ideal para se expor a uma nova concussão.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

#### 2.1.1 Definição e quadro epidemiológico

O Traumatismo Cranioencefálico (TCE) é definido como uma alteração na função cerebral causada pela aplicação de uma força externa ao encéfalo (MENON et al., 2010b) ou como “uma agressão ao cérebro, de natureza não degenerativa e não congênita causada por uma força física externa, que pode produzir um estado diminuído ou alterado de consciência” (UMPHRED, 1994). Em todo o mundo, anualmente, mais de 69 milhões de pessoas são acometidas pelo TCE (DEWAN et al., 2018) e, em 2014, ocorreram aproximadamente 2,87 milhões de visitas a Departamentos de emergência, hospitalizações e mortes relacionadas ao TCE nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com dados fornecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Ainda de acordo com o CDC, estima-se que o gasto anual com o TCE gire em torno de U\$75.5 bilhões por ano nos EUA, incluindo gastos médicos diretos e indiretos, o que demonstra um aumento significativo comparado ao ano de 1995, quando eram gastos U\$56,3 bilhões (FARHAD et al., 2013). Na economia global, estima-se que os déficits gerados pelo TCE sejam em torno de U\$400 bilhões por ano (MAAS et al., 2017). Todos esses dados corroboram com a faceta que o TCE atingiu, nos últimos anos, de ser um grande problema de saúde pública e uma “epidemia silenciosa” (LANGLOIS et al., 2006).

Atualmente o TCE é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em comunidades dos Estados Unidos da América (SIGNORETTI et al., 2011), onde atinge cerca de 2.5 milhões de pessoas por ano (BARRIO et al., 2015; TAYLOR et al., 2017). No Brasil, segundo o DATASUS, houveram 125.500 internações em decorrência do TCE entre o período de 2008 a 2012, gerando gastos aproximados a R\$156.300.00 (DE ALMEIDA et al., 2016; FERNANDES; SILVA, 2013; MAGALHÃES et al., 2017). Alguns estudos demonstram que a incidência do evento chega a ser 3.5 vezes maior em homens, sendo estes os casos mais graves (DE ALMEIDA et al., 2016). É importante ressaltar também que a população jovem, com faixa etária entre 10 e 20 anos de idade, demonstra ser a mais recorrente nos casos de TCE (ELOIA et al., 2011; SANTOS et al., 2013). No Brasil, entretanto, os dados epidemiológicos ainda são escassos, e isso deve-se a subnotificação dos casos, sugerindo que os índices de TCE podem ser muito maiores do que se sabe hoje (MAGALHÃES et al., 2017).

## 2.1.2 Classificação do TCE

Para facilitar o estudo do tema, é proposto que o TCE possa ser classificado de acordo com: A) à gravidade das lesões; B) ao mecanismo físico da lesão; C) à distribuição das lesões; D) à progressão das lesões.

### 2.1.2.1 Classificação quanto à gravidade das lesões

A classificação da gravidade do TCE pode ser feita através de indicadores clínicos, avaliando o nível de consciência do indivíduo acometido pelo evento, como é o caso da Escala de Coma de Glasgow (ECG) (**Tabela 1**), a mais utilizada logo após o acidente, em ambientes hospitalares (TEASDALE; JENNETT, 1974). Essa escala atribui escores para sinais clínicos e, a soma destes é então utilizada para categorizar os pacientes de acordo com a severidade do TCE: para classificar o TCE em um grau leve (TCEL ou Concussão), o paciente deverá responder a escala e produzir um escore entre 13-15, podendo apresentar também uma perda de consciência breve, de no máximo 30 minutos. O TCE é moderado quando o paciente apresenta um escore de 9-12 junto a uma perda de consciência maior que 30 minutos, e o TCE é classificado como grave quando a avaliação na escala permanece menor que 8 ou a perda de consciência perdure por mais que 24 horas.

Tabela 1 – Escala de Coma de Glasgow

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	√	À pressão	2
Ausência persistente de abertura ocular, sem fatores de interferência	√	Ausente	1
Olhos fechados devido a fator local	√	Não testável	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

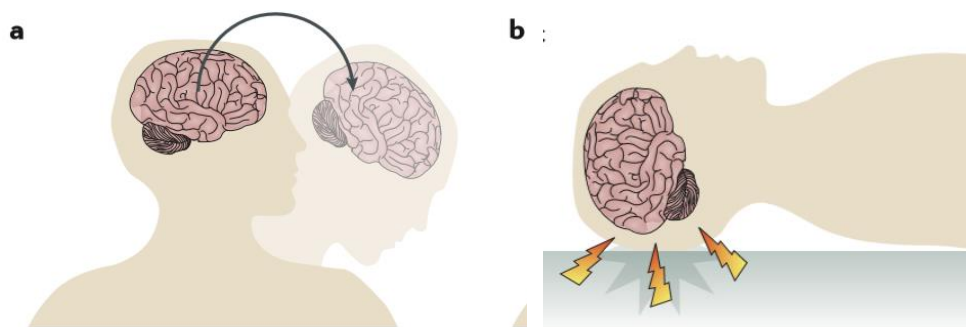
MELHOR RESPOSTA MOTORA			
CRITÉRIO	VERIFICADO	CLASSIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO
Cumprimento de ordens com 2 ações	√	A ordens	6
Elevação da mão acima do nível da clavícula ao estímulo na cabeça ou pescoço	√	Localizadora	5
Flexão rápida do membro superior ao nível do cotovelo padrão predominante não anormal	√	Flexão 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

Fonte: Adaptado de <http://www.glasgowcomascale.org>.

### 2.1.2.2 Classificação quanto ao mecanismo físico das lesões

Impacto por contato ocorre (**Figura 1.B**) quando algum objeto entra em contato com o crânio, ou o crânio colide com algum objeto (comum em quedas e perfurações) (SAATMAN et al., 2008) Já no dano por aceleração e desaceleração (**Figura 1.A**), não necessariamente existe um contato de um objeto externo diretamente no crânio do indivíduo, mas a quebra da inércia do encéfalo dentro da caixa craniana por um movimento brusco pode ocasionar movimentos em velocidades díspares da estrutura cerebral (por essas estruturas possuírem densidades diferentes) (ANDRADE et al., 2009) levando a tensões de cisalhamento e compressão no tecido cerebral. Esse segundo tipo de mecanismo físico de lesão do TCE é o mais comum em acidentes de carro e nas concussões vistas em prática de esportes de contato (BLENNOW et al., 2016).

Figura 1 – Tipos de lesões no TCE



Fonte: Adaptado de (BLENNOW et al., 2016).

### *2.1.2.3 Classificação quanto à distribuição de lesões*

De forma clássica, a classificação da distribuição da lesão ocasionada pelo TCE se dá em focal ou difuso. O TCE Focal geralmente ocorre quando o mecanismo físico da lesão é por contato, levando a compressão focal das estruturas cerebrais localizadas abaixo do crânio do lado do impacto, levando a lacerações, hematomas e morte celular local (ANDRIESSEN et al., 2010). No caso do TCE difuso, o mecanismo físico de lesão geralmente se dá por aceleração e desaceleração, e se caracteriza principalmente pelo dano axonal difuso (DAD) (ANDRIESSEN et al., 2010; BLENNOW et al., 2016). Apesar dos mecanismos diferentes, ambos podem levar a perda de consciência, disfunções motoras, amnésia e até mesmo coma (ANDRIESSEN et al., 2010).

### *2.1.2.4 Classificação quanto à progressão das lesões*

Essa classificação refere-se à separação do dano primário e do dano secundário do TCE. O dano primário envolve qualquer dano mecânico ao encéfalo no momento do TCE, independente do mecanismo físico que o cause (BLENNOW et al., 2016). Assim, é incluído no dano primário o rompimento de vasos sanguíneos (hemorragias e hematomas) e as lacerações no tecido cerebral, como o DAD. O dano primário não tem tratamento, podendo apenas ser evitado ou minimizado com políticas sócio educativas, como as campanhas de combate à violência urbana e para o uso de cinto de segurança e capacetes (XIONG et al., 2013).

O dano secundário se refere a todas consequências neuroquímicas, metabólicas, cognitivas e psicológicas do dano primário, podendo estender-se dos minutos iniciais até anos após o evento (SAATMAN et al., 2008). A natureza do dano secundário não é estática, apresentando uma janela temporal que permite intervenções terapêuticas para prevenir ou reduzir a progressão do dano.

## **2.2 CONCUSSÃO**

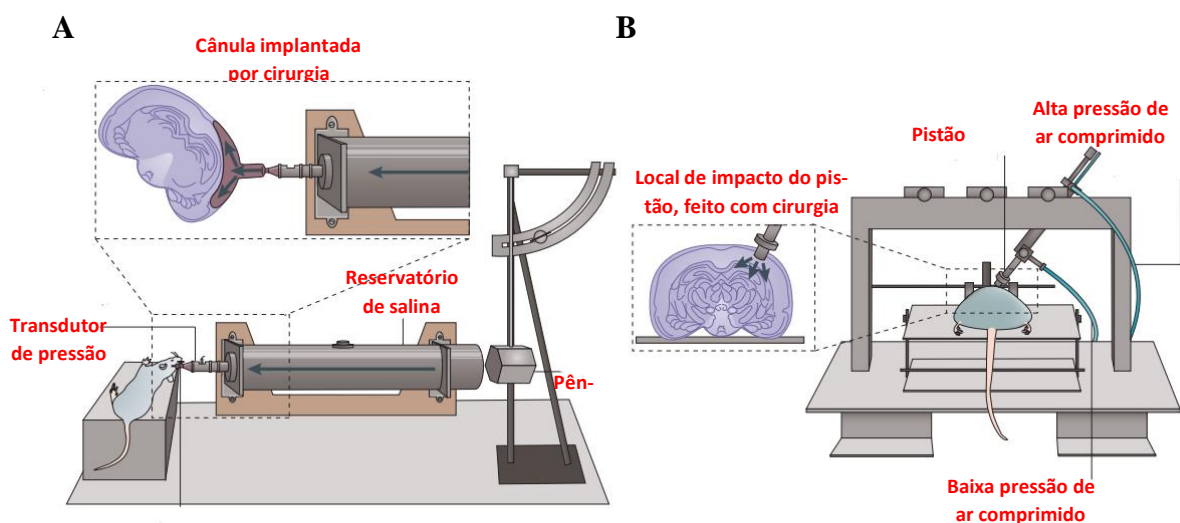
Traumatismo Cranioencefálico Leve (TCEL) e Concussão são termos intercambiáveis e equivalentes que correspondem de 80 a 90% dos casos de TCE (MCCRORY, 2013). A concussão é tipicamente causada por um trauma brusco e não-penetrante na cabeça, com meca-

nismo físico da lesão primária geralmente ocorrendo por aceleração e desaceleração, ocasionando uma distribuição difusa da lesão e com os acometidos apresentando geralmente um escore de 13 a 15 na ECG (LI et al., 2016; MCCRORY et al., 2013).

Entretanto, assim como é a forma mais comum de TCE, a concussão é também a forma com mais subnotificação, e isso deve-se a sutilidade do seu dano primário, assim como do seu dano secundário, uma vez que pode não ocorrer perda de consciência e nem alterações no padrão estrutural de imagem do encéfalo após um evento concussivo (BLENNOW et al., 2016). Além disso, a concussão é amplamente relacionada com a prática de esportes, principalmente os de contato, onde acomete cerca de 3,8 milhões de atletas por ano (HOBBS et al., 2016).

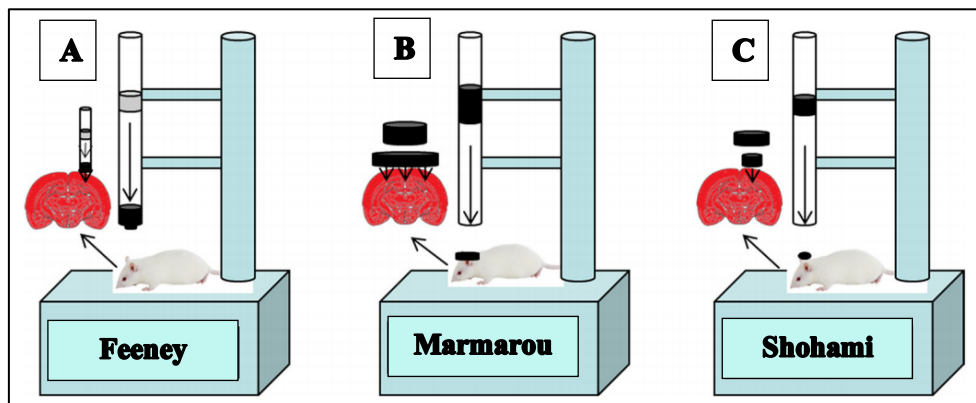
Estudos em modelos animais, principalmente em ratos, ajudaram a elucidar os mecanismos bioquímicos de eventos neurotraumáticos. Esses estudos utilizam diferentes métodos para induzir a concussão nos animais (**Figuras 2 e 3**), sendo que, os mais comuns na literatura são os modelos de Lesão por Percussão de Fluido (LPF, Fig. 2A) (GURKOFF et al., 2009), Impacto Cortical Controlado (ICC, Fig. 2B) (LONGHI et al., 2005) e, o mais reconhecido por mimetizar um evento concussivo por ser menos invasivo, o modelo de queda livre de peso (em inglês *WeightDrop*, portanto, WD) (MANNIX et al., 2014; VAGNOZZI et al., 2005; VAGNOZZI et al., 2007). O método utilizado no Capítulo II do presente trabalho é baseado no modelo de WD de Marmarou (Figura 3B), com peso e altura de acordo com (MANNIX et al., 2014).

Figura 2 - Modelos experimentais de TCE A) lesão por percussão de fluido (LPF e B) impacto cortical controlado (ICC)



Fonte: Adaptado de (XIONG et al., 2013).

Figura 3 - Modelos experimentais de TCE induzidos por WD. **A)** modelo de WD focal de cabeça aberta de Feeney: envolve uma cirurgia prévia para expor o cérebro ou crânio para que seja atingido por um peso em queda livre no local específico; **B)** modelo de WD de Marmarou: sem a necessidade de cirurgia, o peso deve atingir toda a área cortical superficial do cérebro; **C)** modelo de Shohami: semelhante ao modelo de Feeney, o peso cai em um lado específico do encéfalo, porém, não envolve uma cirurgia prévia.

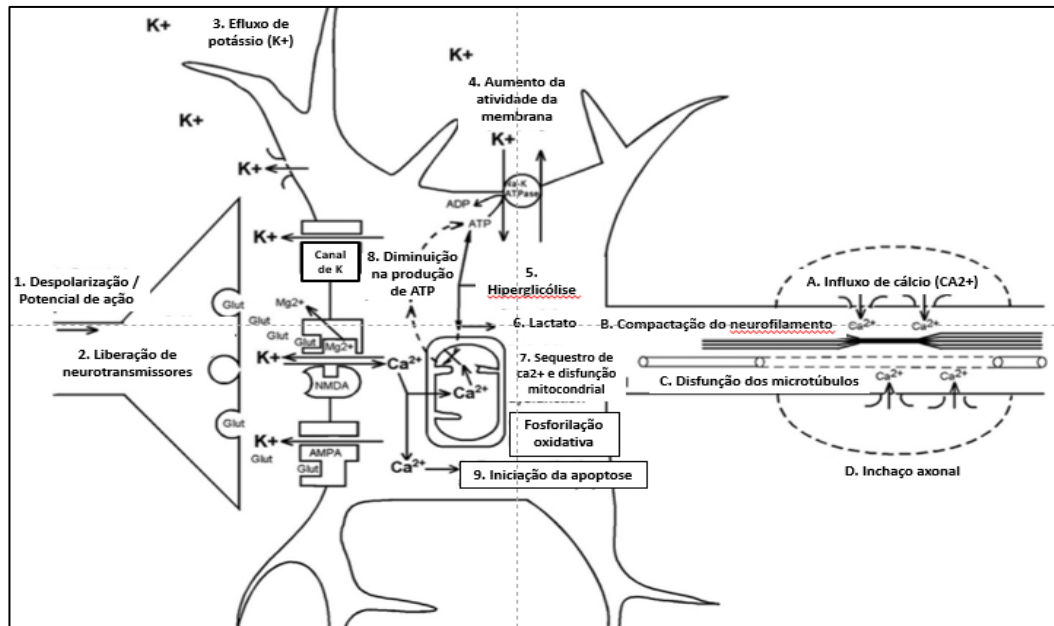


Fonte: Adaptado de (MA et al., 2019).

### 2.2.1 Mecanismos celulares de dano do evento concussivo

É proposto que o evento concussivo envolva os mesmos mecanismos celulares descritos para os TCE mais graves, mas com uma magnitude menor. Como descrito por Barkhoudarian et al (2016a), o dano primário de uma concussão ocasiona uma tensão de cisalhamento nos axônios (dano axonal difuso) e também pode causar a disrupção de membranas celulares na região do impacto. Em ambos os casos, ocorre uma despolarização rápida e descontrolada, que leva à liberação indiscriminada de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica, como por exemplo, o Glutamato. O excesso desse neurotransmissor na fenda sináptica estimula seus receptores, como o Receptor N-Metil D-Aspartato (NMDAR) no neurônio pós-sináptico, o que leva ao influxo de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e a propagação da despolarização, que acaba se tornando generalizada, podendo atingir outras regiões do encéfalo (BARKHOUDARIAN et al., 2016b; FADEN et al., 1989). Para tentar repolarizar os neurônios, bombas iônicas, como a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aumentam sua atividade, aumentando também a demanda energética celular, o que leva a hiperglicólise e a geração de Radicais Livres (RL) e Espécies Reativas a Oxigênio (ERO). O excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  no neurônio também é responsável por causar dano às mitocôndrias (VERWEIJ et al., 1997), levando a alteração do seu funcionamento, mais geração de RL e ativação de rotas de apoptose (ROBERTSON et al., 2007).

Figura 4 - Cascata de eventos bioquímicos no neurônio ocasionada por uma concussão



Fonte: (BARKHOUDARIAN et al., 2016a).

Toda essa cascata de eventos sinaliza também para uma resposta pró-inflamatória, que é dada por células da glia, principalmente a Microglia e os Astrócitos, que respondem via secreção de citocinas, quimiocinas e ativação da defesa imunológica adaptativa (CORDIGLIERI; FARINA, 2010), que é muito importante para o reparo do dano ocasionado pelo insulto concussivo (GODINHO et al., 2021). Porém, todas essas respostas podem ter intensidades muito diferentes de acordo com a gravidade do impacto, já que nenhuma concussão é exatamente igual a outra (BLENNOW et al., 2016).

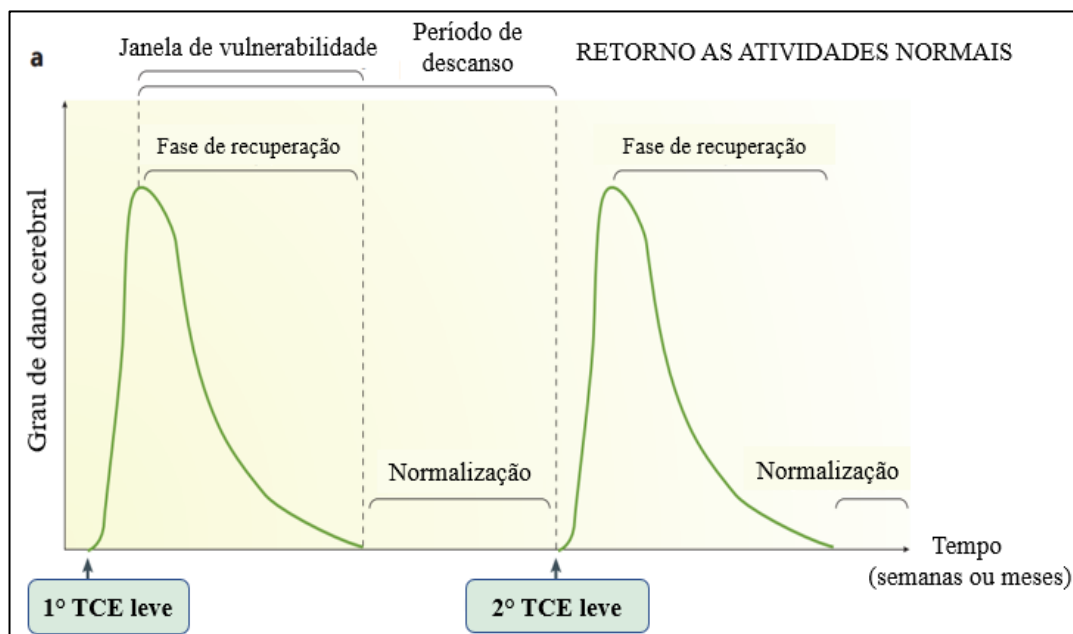
### 2.2.2 Concussões relacionadas a prática de esportes

Uma associação entre lesões na cabeça em esportes de contato e distúrbios neuropsiquiátricos crônicos foi primeiramente descrita por Martland, em 1928, como “A Síndrome do Pugilista” (MARTLAND, 1928). Critchley propôs alguns anos mais tarde, o nome Encefalopatia Traumática Crônica (ETC) (CRITCHLEY, 1949; CRITCHLEY; MACDONALD, 1957) para descrever a natureza dessa desordem. A neuroinflamação crônica é o fator que aparece como o mais forte elo entre o desenvolvimento de desordens neurológicas e psiquiátricas após concussões repetitivas, por ser um a marca do ETC e também de diversos quadros neurodegenerativos que podem ter seu gatilho para o desenvolvimento após o TCE, como a doença de Alzheimer e

de Parkinson, estresse pós-traumático, depressão, ansiedade e a epilepsia pós-traumática (FLEMINGER et al., 2003; KHARATISHVILI; PITKÄNEN, 2010; LI et al., 2020a; OMALU et al., 2010; THEADOM et al., 2018). Sendo assim, é sugerido que, devido a potencial evolução do dano secundário, a concussão deve ser tratada como uma doença em progresso, e não como um evento estático (MASEL; DEWITT, 2010).

É pouco provável que uma única concussão durante a prática de esportes resulte em efeitos adversos em longo prazo, porém se uma outra concussão ocorre dentro desse período de tempo em que o encéfalo ainda está respondendo ao insulto anterior, o efeito somatório dos danos secundários pode levar a uma resposta neuroinflamatória exacerbada (Figura 5), podendo se tornar até mesmo uma condição crônica, com efeitos semelhantes a de um TCE moderado (BLENNOW et al., 2016).

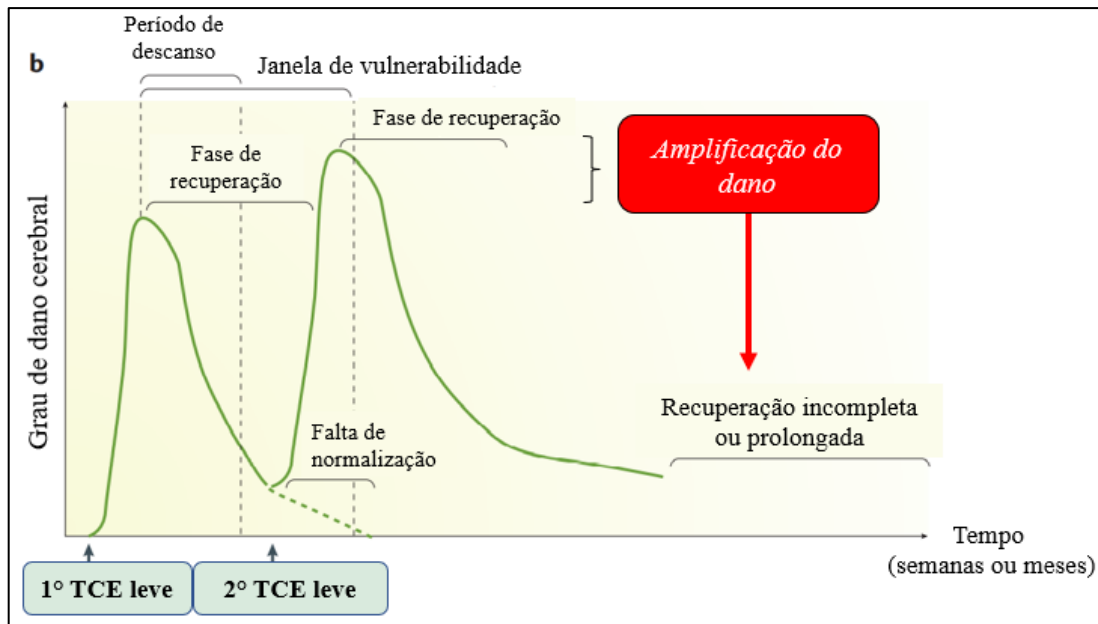
Figura 5 - A) Janela de vulnerabilidade a um segundo evento concussivo com período adequado de descanso



Fonte: Adaptado de (BLENNOW et al., 2016).



Figura 5 - B) Efeito somatório de um segundo TCE leve dentro da janela de vulnerabilidade do primeiro evento concussivo



Fonte: Adaptado de (BLENNOW et al., 2016).

Atualmente no cenário esportivo, a literatura enfatiza a necessidade de um período de recuperação antes do retorno às práticas esportivas para a normalização da função cerebral (BLENNOW et al., 2016), entretanto, a maioria desses TCE leves ocorrem com ausência da perda de consciência, o que deixa mais difícil a identificação dos casos. A subnotificação permite que jovens praticantes de futebol americano experienciem, em apenas uma temporada na faculdade, mais de 1000 eventos concussivos de acordo com (CRISCO et al., 2011a). Em outros dois estudos que utilizaram acelerômetros nos capacetes de crianças praticantes de futebol americano, foram registradas médias de 240 (indivíduos de 9 a 12 anos) e 252 (jovens de 11 a 13 anos) concussões em uma temporada (COBB et al., 2013; MUNCE et al., 2015). Além disso, foi estimado em 2016, que cerca de 1.1 a 1.9 milhões de concussões, relacionadas apenas a esportes, ocorram por ano em jovens abaixo de 18 anos nos EUA (BRYAN et al., 2016). Entretanto, vale destacar que muito da preocupação acerca da janela de vulnerabilidade de concussões recorrentes reside no cérebro dos acometidos, e pouco se sabe sobre como se dá essa janela de vulnerabilidade em outros órgãos do corpo.

## 2.3 O EFEITO PERIFÉRICO DO TCE

Pela capacidade do TCE afetar diversos centros de controle importantes do nosso cérebro (SCHNEIDER et al., 2007), sabe-se hoje que o dano secundário não se limita apenas ao sistema nervoso central. Já é estabelecido, por exemplo, que um TCE pode causar danos ao fígado (DE CASTRO 2017b; VILLAPOL S. et al., 2015a), baço (ZHANG; JIANG, 2015b) e, mais recentemente, ao Intestino (BANSAL et al., 2009). O que mais chama a atenção é que os danos nesses órgãos periféricos podem exacerbar o efeito do TCE no cérebro, já que, após um evento lesivo a barreira hemato encefálica (BHE) pode estar danificada, com sua permeabilidade aumentada, o que deixa o cérebro vulnerável para infiltração de citocinas e quimiocinas produzidas em outras partes do corpo (ANTHONY et al., 2012b; WASHINGTON et al., 2016). Entretanto, o campo de pesquisa acerca dos danos periféricos do TCE é relativamente novo, e literatura ainda carece de mais investigações acerca do efeito periférico de concussões em outros órgãos, como o intestino.

### 2.3.1 TCE e o eixo cérebro-intestino

Nos últimos anos, o eixo de comunicação que existe entre o cérebro-intestino tem ganhado cada vez mais atenção da literatura e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), das 450 milhões de pessoas que sofrem de depressão e outras desordens psiquiátricas e de humor no mundo, 50% a 60% apresentam disfunções intestinais (AGRAWAL et al., 2020). Em doenças neurodegenerativas, o papel do eixo cérebro-intestino também está em evidência. No campo de pesquisa do Mal de Parkinson, por exemplo, existem evidências de que manifestações gastrointestinais precedem sintomas motores clássicos da doença, assim como é proposto que a doença em si comece pelo intestino, até atingir o cérebro (CHAI et al., 2020; CHALLIS et al., 2020).

A estreita relação entre um TCE e uma subsequente lesão na mucosa intestinal já é reconhecida (HANG et al., 2003a; JIN et al., 2008; JIN et al., 2009; JIN et al., 2010; KATZENBERGER; REBECCA et al., 2015b). Essa lesão na mucosa ocasiona a disfunção da barreira intestinal (KHARRAZIAN, 2015a; MA et al., 2017a), aumentando a permeabilidade do intestino, o que fica evidenciado pela diminuição na expressão de proteínas das *tightjunctions* (BANSAL et al., 2009; ZHANG; JIANG, 2015b) que regulam a permeabilidade paracelular (KATZENBERGER, R. J. et al., 2015a), Tais eventos podem ocasionar adisbiose, que é a alteração da composição da microbiota intestinal, observada até mesmo 20 anos após um TCE

em humanos (URBAN et al., 2020). Este quadro pode levar a endotoxemia (aumento de toxinas derivadas de bactérias intestinais no sangue), o que pode provocar uma resposta imune inata, levando a um quadro de inflamação sistêmica. É proposto que todo esse quadro possa exacerbar a neuroinflamação ocasionada pelo TCE, principalmente naqueles que possuem um histórico de eventos traumáticos, devido à quebra da barreira hematoencefálica e o estado de sensibilidade que a micróglia se encontra (chamado de “primedmicroglia”) (SUNDMAN et al., 2017b). Em análises *post mortem* feita em pacientes que sobreviveram mais de um ano após um TCE, foi evidenciado que esses indivíduos são 12 vezes mais propensos a morrer de septicemia e 2.5 vezes mais propensos a morrer devido a condições do sistema digestivo do que a população em geral (HARRISON-FELIX et al., 2009).

Ma et al. (2017) mostraram um dano crônico (28 dias após) na mucosa do cólon de camundongos que foram submetidos a um TCE moderado (induzido por CCI). Estes mesmos animais quando submetidos à um desafio infeccioso, ocasionado por uma bactéria intestinal, apresentavam um aumento na inflamação à nível cerebral. Estes dados reforçam não só o efeito do TCE no intestino, mas também o aumento da susceptibilidade do cérebro à resposta de um desafio periférico após o dano intestinal ocasionado pelo TCE.

A inflamação crônica aparece como o grande fator de dano ao intestino após um TCE, e o Fator de Necrose Tumoral – Alfa (TNF- $\alpha$ ) é apontado como a principal citocina inflamatória nesse cenário (ANTHONY et al., 2012b; BANSAL et al., 2010). A liberação de TNF- $\alpha$  é causada pela estimulação de Toll-like receptor (TLR) em macrófagos intestinais, a partir daí um *looping de feedback* positivo é iniciado entre o TNF- $\alpha$  e o fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias NF- $\kappa$ B (STOECKLEIN et al., 2012). Estudos demonstram que altos níveis de TNF- $\alpha$  se correlacionam com elevados níveis de Miosina quinase de cadeia leve (MLCK), e este poderia ser o meio pelo o qual a citocina aumenta a permeabilidade paracelular intestinal (BANSAL et al., 2009; ZHANG; JIANG, 2015b). É estabelecido também, pela literatura, que o estresse oxidativo está envolvido na progressão da disfunção intestinal após TCE (SHOHAMI et al., 1999), e que a mesma é capaz de induzir a inflamação persistente (JIN et al., 2008; JIN et al., 2009; JIN et al., 2010).

Em modelos experimentais tanto de TCE moderado, grave e concussão, ainda está sendo investigada a forma pela qual o insulto lesivo no cérebro afeta também o intestino (SUNDMAN et al., 2017b). O eixo de comunicação bidirecional que existe entre cérebro e intestino constitui-se de vias neuronais, imunes e endócrinas (YOO; MAZMANIAN, 2017). Vale ressaltar que todas essas vias se entrelaçam em diversas situações, por exemplo, sabe-se hoje que tanto a inflamação intestinal, a hiperativação do eixo HPA e o aumento da permeabilidade intestinal

são fatores que afetam negativamente a composição da microbiota intestinal (FARZI et al., 2018; FRANKIENSZTAJN et al., 2020). A ativação de resposta ao estresse do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) faz com que o córtex adrenal produza e libere na circulação o cortisol (corticosterona em roedores) (FRANKIENSZTAJN et al., 2020), que é um hormônio com grande densidade de receptores no cólon intestinal, onde estimula a atividade intestinal, e a troca de íons (aumentando a atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase), assim como exerce ação anti-inflamatória (AGRAWAL et al., 2020; RAO, 2011). Evidências recentes apontam que o TCE e as concussões recorrentes atuam como um agente estressor (HOULDEN, A. et al., 2016b), ativando o eixo HPA (KOSARI-NASAB et al., 2019a; KOSARI-NASAB et al., 2019b; TABOR et al., 2019) e, no caso das concussões recorrentes, a repetição do estresse pode causar o comprometimento do feedback negativo do eixo, gerando uma hiperativação do eixo. Em modelos experimentais, a indução de estresse crônico aumenta a permeabilidade intestinal e reduz o limiar para indução de colite em roedores (POWELL et al., 2017a).

### *2.3.1.1 O intestino*

Ivan Petrovich Pavlov, na virada do século XIX, foi pioneiro ao demonstrar que o cérebro influencia diretamente funções intestinais através de nervos periféricos chave (TANSEY, 2006). Entretanto, mais recentemente, a literatura demonstra que o Intestino também é capaz de influenciar o cérebro, através de sinais metabólicos, endócrinos, mediadores imunes e neuronais, existindo assim uma interface bidirecional de comunicação entre o SNC e o Intestino (FURNESS, 2012). O intestino é dividido em Intestino Delgado (composto por Duodeno, Jejuno e Íleo) e Intestino Grosso (constituído pelo Ceco e Cólon), sendo que cada parte possui uma função diferente, assim como apresenta um microbioma (composto de bactérias, fungos e vírus) diferente do outro (MA, ELISE L et al., 2017a; WANG, M. et al., 2005). Anatomicamente, o tecido intestinal é dividido em serosa, mesentério, musculatura, submucosa, lâmina própria, epitélio e lúmen.

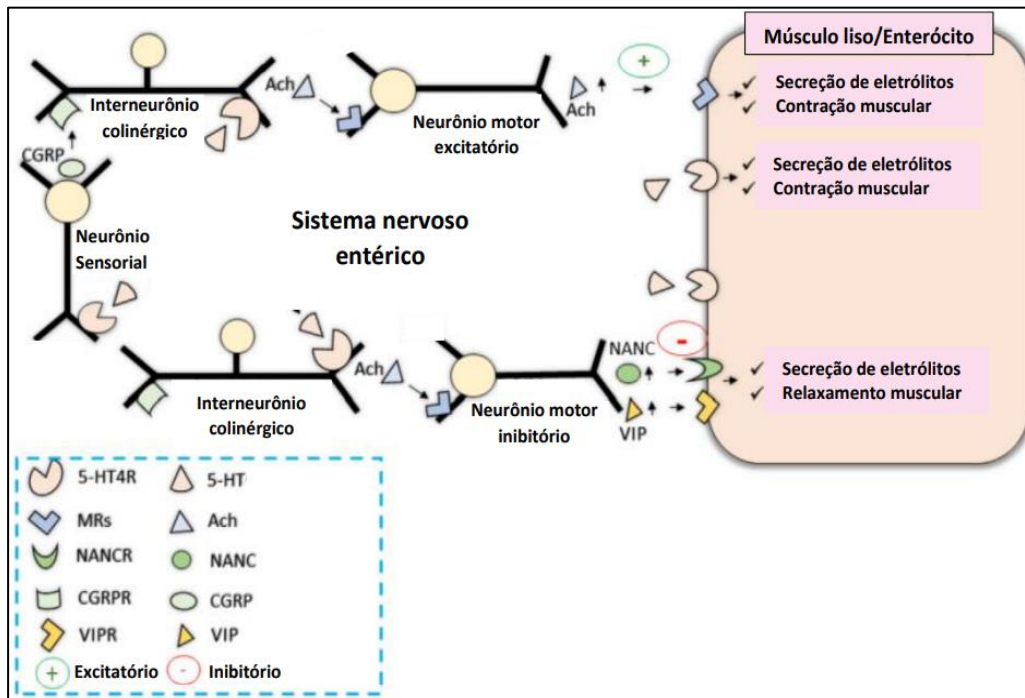
O intestino é um importante órgão da periferia que compõe o Trato Gastrointestinal, responsável pela digestão, absorção e excreção de alimentos, assim como pela produção de neurotransmissores (GYURASZOVA et al., 2017) e, também é casa de 70% a 80% das células imunes do corpo (KAGNOFF et al., 1987) e de cerca de 100 milhões de neurônios que compõem o Sistema Nervoso Entérico (SNE) (FURNESS et al., 2014). O SNE é uma rede neural autônoma composta de neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores, organizados

em plexos com inúmeros gânglios, que se comunicam para mediar reflexos intrínsecos do trato Gastrointestinal. Os dois principais plexos são o submucoso (ou de Meissner) e o mioentérico (ou de Auerbach). Sabe-se também que o SNE possui suas próprias células gliais e que as principais linhas de comunicação com o SNC ocorrem através do Nervo Vago e de Nervos Espinhais (SUNDMAN et al., 2017b).

A homeostase do funcionamento intestinal envolve processos complexos (**Figura 6**) como (I) a excreção e absorção de eletrólitos ao longo de todo o trato intestinal e, (II) os movimentos peristálticos de contração e relaxamento do músculo liso, regulados primariamente por neurotransmissores como a Acetilcolina (ACh) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT) secretados pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE) (AGRAWAL et al., 2020; YOO; MAZMANIAN, 2017). Já o transporte de eletrólitos pelo intestino é um balanço de processos absorptivos e secretórios de íons, todos dependentes da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  localizada na membrana basolateral (MBL), quando esse balanço de eletrólitos é afetado, pode resultar em diarreia ou constipação (RAO, 2011).

O movimento transepitelial de pequenas moléculas e íons, entre sangue e lúmen, ocorre pela via transcelular, através de transportadores específicos de membrana, ou pela via paracelular, definida pela geometria do espaço entre células epiteliais adjacentes, o que é regulado pelas proteínas das *Tightjunctions*. Essas duas vias, juntamente com a mucosa do lúmen, definem a barreira intestinal, que filtra a passagem de agentes nocivos para a circulação sistêmica. O equilíbrio de todo esse sistema é crítico pra manutenção do bem estar do indivíduo (MA et al., 2017b; RAO, 2011).

Figura 6 - Homeostase do funcionamento intestinal. Legenda: 5-HT: serotonina; 5-HT4R: receptor de serotonina 4; MRs: receptores muscarínicos de acetilcolina; Ach: acetilcolina; CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitocina; CGRPR: receptor de CGRP; NANC: transmissor não noradrenérgico e não olinérgico; NANC: receptor de NANC; VIP: peptídeo vasoativo intestinal; VIPR: receptor de VIP.



Fonte: Adaptado de (AGRAWAL et al., 2020).

A população bacteriana é a mais dominante na Microbiota Intestinal. Estimativas recentes demonstram que há mais bactérias do que células no corpo humano, sendo o número delas algo aproximado à  $3 \times 10^{13}$  (SENDER et al., 2016) e que, a maior parte delas se concentra no Cólon, a região do corpo mais colonizada (SENDER et al., 2016). A população bacteriana do intestino é parcialmente herdada da mãe durante o nascimento, entretanto, muitos fatores ambientais como o estilo de vida e, de acordo com achados recentes, o TCE, podem influenciar a sua composição, assim como a composição alterada desse microbioma pode estar relacionado com a progressão de transtornos como o Depressivo, Alzheimer e Parkinson (BLASER, 2011; GRONLUND et al., 1999). Tudo isso torna a Microbiota um importante componente do eixo de comunicação entre o cérebro e o intestino.

Coletivamente, os micro-organismos que compõem esse microbioma liberam energia e nutrientes de alimentos e “educam” o sistema imune do intestino a se proteger de desafios antigênicos apresentados pelo o que foi ingerido. Ainda não são completamente elucidadas todas as funções que a microbiota exerce no nosso corpo, entretanto, sabe-se que elas participam na

modulação de processos de neurotransmissão, neurogênese, ativação microglial, síntese de neurotransmissores, formação de células do sistema imune e que também demonstram grande influência sobre o humor (MAYER et al., 2015; SAMPSON; MAZMANIAN, 2015). Entretanto, as próprias bactérias que compõem esse microbioma precisam ser limitadas de se translocarem através da parede celular que o epitélio intestinal compõem, ou irão iniciar respostas inflamatórias, levando a lesões teciduais (RAMANAN; CADWELL, 2016). Até o momento, dois artigos em modelos experimentais já exploraram efeitos da somatória de concussões na composição da microbiota intestinal. Porém, os resultados obtidos não são muito conclusivos, ou por apresentarem um n amostral baixo (MATHARU et al., 2019), ou por apenas observar em uma mudança transitória da constituição bacteriana, sem outras análises no tecido intestinal (ANGOA-PEREZ et al., 2020).

### *2.3.1.2 Estresse oxidativo e inflamação no intestino*

No TGI as fontes de ERO e Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN) são: 1) as mitocôndrias, através da redução incompleta do Oxigênio na cadeia transportadora de elétrons (MITTAL et al., 2014); 2) as formas das enzimas NADPH Oxidases presentes em fagócitos e que produzem ERO como um mecanismo de defesa contra patógenos e 3) as Sintase de Óxido Nítrico (NOS) que catalisam a produção de Óxido Nítrico ( $\text{NO}^\circ$ ), um radical que é essencial para muitas funções de regulação no TGI, mas que em excesso inibe a citocromo - c oxidase na mitocôndria, levando a formação de Superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que pode reagir com o próprio  $\text{NO}^\circ$  formando o Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), uma ERN altamente danosa (AVIELLO; KNAUS, 2017; KAWANISHI; MURATA, 2006).

O estresse oxidativo é um estado de desbalanço onde a produção de RL e ERO prevalece sobre a capacidade antioxidante da célula. Os RL são moléculas pequenas que possuem elétrons desemparelhados, como o  $\text{O}_2^-$  e o radical Hidroxil ( $^{\circ}\text{OH}$ ), sendo assim, altamente reativas. A produção prolongada de ERO pode causar danos ao DNA, proteínas e a Lipídios, como os que constituem as membranas celulares (KAWANISHI; MURATA, 2006; MITTAL et al., 2014).

O dano aos lipídios da membrana celular causado durante o estresse oxidativo é a Peroxidação Lipídica ou Lipoperoxidação. Os Ácidos Graxos Poliinsaturados, constituintes das membranas plasmáticas, são alvos de qualquer RL primário que consiga extrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno da sua cadeia. Essa reação produz metabólitos como o 4-hidroxinonal e o Malondialdeído (MDA). Sendo assim, em técnicas bioquímicas, a concen-

tração desses metabólitos no meio serve como uma estimativa indireta do processo de peroxidação lipídica e estresse oxidativo, como é o caso da mensuração da concentração de MDA, que é uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Com a lipoperoxidação ocorre então uma perda de seletividade na troca iônica, aumento da permeabilidade celular e liberação do conteúdo de organelas, o que pode comprometer a barreira intestinal (MITTAL et al., 2014; STOJILJKOVIĆ et al., 2009).

O epitélio do TGI funciona como uma barreira física para a microbiota e outros patógenos e substâncias nocivas. A mucosa intestinal responde com sinais pró-inflamatórios a agentes infecciosos e, para espécies inofensivas, com sinais de tolerância imune (NANNO et al., 2008). Manter a integridade da barreira é um pré-requisito para a manutenção da homeostase intestinal (MITTAL et al., 2014; STOJILJKOVIĆ et al., 2009). A quebra da barreira pode levar à disbiose e a translocação de bactérias do lúmen para a Lâmina própria, ativando fagócitos profissionais e a produção de ERO. Ao mesmo tempo as células epiteliais produzem ERO, que participam do reparo tecidual da barreira regulando sinais intracelulares (NANNO et al., 2008). Sendo assim, níveis persistentes de estresse oxidativo denotam dano tecidual e também inflamação crônica no intestino, o que é associado a vários quadros de doenças inflamatórias intestinais e, mais recentemente, neurológicas (SPIELMAN et al., 2018; SUNDMAN, M. H. et al., 2017b).

A inflamação intestinal, que pode ser induzida por TCE, além de gerar um estado de estresse oxidativo leva também a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (JIN et al., 2008; 2009). Essas citocinas podem atuar em seus receptores localmente e perpetuar um “ciclo vicioso” inflamatório, ativando o fator de transcrição NF-k $\beta$  que irá induzir a produção e liberação de mais citocinas pró-inflamatórias (KHARRAZIAN, 2015b; MA et al., 2005). Além disso, essas citocinas podem entrar para a circulação e agir em outros órgãos, como o próprio cérebro, onde induzirão uma resposta neuroinflamatória (SUNDMAN et al., 2017b). O TNF- $\alpha$  no intestino também está relacionado com o aumento da expressão da Quinase da Miosina de Cadeia Leve (MLCK em inglês), que fosforila o anel de actomiosina na musculatura lisa intestinal, gerando sua contração, o que resulta na abertura da via paracelular da barreira intestinal devido ao fato de que as proteínas constituintes das tight junctions estão ancoradas a actina (MA et al., 2005). Além disso, a inflamação intestinal pode ser sentida por fibras aferentes no nervo vago, ativando o “Arco reflexo antiinflamatório colinérgico”, uma via neuronal do eixo cérebro-intestino (WILLEMZE et al., 2015). O destino final desse arco reflexo se dá com a ligação da ACh, liberada por fibras eferentes do nervo vago, com seus receptores nicotínicos do tipo alfa 7 (nAChR  $\alpha$ 7), expressos principalmente em macrófagos intestinais e esplênicos (COSTANTINI et al., 2012). Assim, há o favorecimento de

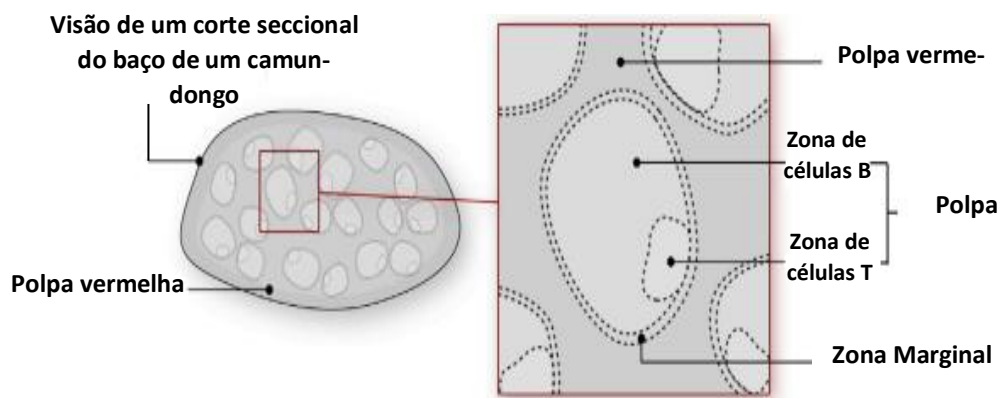


vias anti-oxidantes e de supressão da resposta inflamatória (WAZEA et al., 2018; WILLEMZE et al., 2015). Evidências apontam que o SNE também é capaz de sentir o dano, sintetizar e liberar ACh através do estímulo aos receptores 5HT4R, com a mesma finalidade do nervo vago (KIMURA, H. et al., 2019a).

### 2.3.2 TCE e o baço

O baço é um órgão linfóide secundário que se caracteriza como o principal filtro de patógenos e antígenos do sangue, sendo ele o ponto onde as respostas imunes que são deletérias ao corpo podem ser reguladas (BRONTE; PITTET, 2013). O baço é organizado principalmente em três estruturas: Polpa branca, polpa vermelha e a zona marginal, que reveste a polpa branca, a separando do contato com a polpa vermelha (Figura 7). O sangue arterial entra no baço pela Zona Marginal, e nas polpas vermelhas o sangue é filtrado e o ferro é reciclado. As polpas brancas são muito semelhantes à linfonodos e contém populações de células T e B que geram respostas imunes específicas a antígenos, protegendo o corpo de infecções virais, bacterianas e fúngicas. Os leucócitos no baço incluem vários subtipos de células T e B, células Dendríticas (DCs) e macrófagos (MUELLER; GERMAIN, 2009).

Figura 7 - Visão esquemática da anatomia do baço



Fonte: Adaptado de (BRONTE; PITTET, 2013).

Através da mobilização das suas células imunes, o baço pode estabelecer comunicação com diversos locais do corpo (BRONTE; PITTET, 2013). Por exemplo, em um dano isquêmico

no miocárdio ocorre uma liberação massiva de monócitos do baço para a circulação, até que atinjam o local do dano e contribuam para a regeneração do tecido (SWIRSKI et al., 2009). É proposto que o baço também desempenhe um papel na mediação da resposta colinérgica anti-inflamatória intestinal. Ao detectar sinais de dano (estresse oxidativo/inflamação) no intestino, as fibras aferentes do nervo vago comunicam ao núcleo do trato solitário no tronco encefálico, que processa a informação e sinaliza para núcleo motor dorsal do nervo vago para liberar acetilcolina através de suas fibras eferentes. A chegada de acetilcolina ao gânglio celíaco comunica para que o nervo esplênico libere noradrenalina no baço, estimulando receptores adrenérgicos  $\beta_2$  de Células T que expressam Colina Acetil Transferase a produzirem e liberarem ACh no baço e na circulação, com o objetivo de ligar o neurotransmissor aos seus receptores nAChR  $\alpha_7$ , que são majoritariamente expressos em macrófagos no baço e no intestino, e que quando ativados favorecem um estado antioxidante e anti-inflamatório, favorecendo a via do Nrf2 e suprimindo a via do NF-kB (COSTANTINI et al., 2012; WILLEMZE et al., 2015). Outra forma de comunicação entre o baço e o intestino foi vista em um modelo experimental de choque hemorrágico, onde fatores linfáticos derivados do intestino atingiam a circulação sistêmica e promoviam a apoptose de células imunes do baço via receptores do tipo Toll 4 (TLR4), prejudicando a resposta imune do corpo ao dano (TIESI et al., 2013b).

Principalmente por essa característica central na comunicação com outros órgãos, regulação da resposta imune e distribuição de células imunes pelo corpo que o baço também chamou atenção para pesquisas acerca do seu papel na fisiopatologia do TCE (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). Em um modelo experimental de TCE, a infusão intravenosa de células progenitoras estimula a proliferação de células T  $CD4^+$  residentes no baço e levam a melhora da integridade da BHE, o que pode ser mediado pelo aumento de IL-10 e IL-4 por parte dessas células (WALKER et al., 2010). Assim como foi visto que a indução de um aumento das células Treg no baço atenua a infiltração de neutrófilos e favorece a polarização de macrófagos para M2 (conformação antiinflamatória) em um modelo de TCE (XU et al., 2017). Apesar dos receptores adrenérgicos  $\beta_2$  estarem envolvidos com a resposta anti-inflamatória colinérgica (como descrito acima), é proposto que em situações onde há uma intensa sobreposição da atividade simpática, como logo após um TCE, possa ocorrer a ativação desse receptor em células imunes do baço, como os macrófagos e linfócitos, levando a diminuição de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (NAKAI et al., 2014) e prejudicando a resposta inflamatória que seria benéfica logo após o TCE (GODINHO et al., 2021). A resposta imunológica após o TCE é um campo de pesquisa muito complexo, que envolve respostas diferentes de acordo com cada variação na intensidade

do TCE e muito cuidado na interpretação e extrapolação dos resultados obtidos e, até o momento, nenhuma pesquisa experimental ou clínica investigou o efeito de concussões recorrentes no baço e sua inter-relação com outros órgãos.

## 2.4 EXERCÍCIO FÍSICO

Os efeitos benéficos da prática de exercícios físicos já são bem descritos na literatura quanto aos seus aspectos físicos e cognitivos (BINDER; CHARFMAN, 2004; NEEPER et al., 1995). Tendo em vista isso, a ACSM (*American College of Sports Medicine*) sugere pelo menos 150 minutos por semana de atividade física moderada ou, pelo menos 75 minutos por semana de atividade física vigorosa para melhorar a saúde de indivíduos afetados por doenças crônicas.

De forma aguda, o exercício físico gera uma resposta de estresse no corpo devido ao aumento da demanda energética, aumento da frequência cardíaca, geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias sendo que, quanto mais intenso, maior é a liberação desses mediadores (HAY et al., 2015; OSTROWSKI et al., 1999). Vale destacar que atletas em períodos próximos a competições reportam desconforto intestinal induzido pela hiperativação do eixo HPA, o que também ocorre quando o exercício físico é intenso (a partir de 70% do  $VO_2$ máx) (ROYES, 2020a). O exercício físico extenuante é caracterizado por causar danos ao intestino, principalmente por reduzir o fluxo sanguíneo intestinal, gerando estresse oxidativo e podendo danificar a barreira intestinal, o que pode levar a um estado de inflamação sistêmica devido a translocação de endotoxinas (MACH et al., 2021). Além disso, no baço, durante a prática de exercício físico extenuante existe uma perturbação do sistema imune, induzindo um estado de linfocitose que é logo seguido de um estado de linfopenia, que vem sendo sugerido que ocorra devido à redistribuição desses linfócitos para os tecidos mais lesados durante pelo exercício extenuante (KRÜGER et al., 2008). Essa alteração na função imune está amplamente relacionada com a susceptibilidade de atletas a desenvolverem infecções no trato superior devido ao exercício intenso ou períodos pré-competitivos (GODINHO et al., 2021; ROYES, 2020a).

Entretanto, com a repetição sistemática do exercício físico, controlando a performance e contando com períodos de recuperação adequado o “insulto” de cada sessão, todos esses fatores de estresse gerados com uma sessão aguda de atividade física vão servir como sinalizadores para o corpo ativar vias de adaptação crônicas (GODINHO et al., 2021). Independente da duração (de 4 a 24 semanas) de treino, modelos de exercício aeróbico regular em roedores mostram consistentemente a ativação da sinalização do Nrf2 em diversos tecidos (ASGHAR et al.,

2007; CAMILETTI-MOIRÓN et al., 2015a; CAMILETTI-MOIRÓN et al., 2015b; DA SILVA FIORIN et al., 2016a; JIANG et al., 2014). O fator de transcrição Nrf2 é o grande regulador da defesa antioxidante celular, modulando cerca de 200 genes que respondem ao estresse oxidativo. Em condições basais, o Nrf2 é “preso” no citosol da célula pela proteína Keap 1. Em resposta a um estímulo pró-oxidativo, como no caso do exercício, resíduos de cisteína da Keap 1 são oxidados, sendo modificados para um formato único, que causam a dissociação da proteína com o Nrf2. Ocorre então a translocação do Nrf2 para o núcleo celular, onde ele se liga ao Elemento de Resposta Antioxidante (ARE), iniciando a transcrição de enzimas de defesa antioxidante da fase II. Sendo assim, a indução da expressão e fosforilação do Nrf2, trazendo benefícios na defesa antioxidante do corpo, é reconhecida como um dos principais mecanismos pelo qual a prática regular de exercício físico é benéfica (AAD et al., 2015; ABREU et al., 2017; NARASIMHAN; RAJASEKARAN, 2016). Outros benefícios crônicos gerados pelo exercício físico incluem:

**I)** Redução do tecido adiposo devido a demanda energética do exercício. A redução desse tecido implica na diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios que são produzidos ativamente pelo tecido adiposo branco, como o TNF- $\alpha$  (LINKE et al., 2005).

**II)** Diminuição da expressão de TLR na superfície de células imunes (STEWART et al., 2005a) atenuando a resposta inflamatória do baço.

**III)** Liberação de miocinas do músculo esquelético em atividade, como a irisina, IL-6 e a IL-15, levando a efeitos cognitivos benéficos e a redução do estado pró-inflamatório (DALUZ SCHEFFER; LATINI, 2020b).

**IV)** A liberação de hormônios do estresse durante o exercício como a adrenalina, noradrenalina e o cortisol que podem agir em células imunes por todo o corpo, incluindo o baço, suprimindo a resposta pró-inflamatória (NOBLE et al., 2018b).

**V)** Aumento do trânsito intestinal, reduzindo o tempo de contato de patógenos nocivos com a mucosa do intestino além da diversificação da microbiota intestinal, favorecendo bactérias benéficas, que produzem ácidos graxos de cadeia curta e estimulam a biogênese mitocondrial local (CLARK; MACH, 2017a).

#### **2.4.1 Exercício físico e o TCE**

O aumento do risco para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos ocasionados pelo TCE sugere que existe uma grande janela terapêutica que pode ser usada para tratar e mitigar os danos secundários. Nesse cenário aparece o Exercício Físico como um eficaz tratamento para

o TCE (DA SILVA FIORIN et al., 2016b; DE CASTRO et al., 2017c; LIMA et al., 2009a; SILVA et al., 2013a). Achados clínicos mostram que o exercício físico modula positivamente o humor, e a qualidade de vida de pessoas acometidas por TCE, reduzindo sintomas depressivos (PERRY et al., 2020). Da mesma forma, um estilo de vida saudável é relacionado com melhores respostas após a lesão, uma vez que, junto com o consumo excessivo de dietas hipercalóricas, a falta de atividade física aparece como um agravante do dano secundário do TCE (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019).

Corroborando com os dados clínicos, em estudos onde roedores foram submetidos a seis semanas de natação, o exercício atuou de forma profilática para diminuir a formação de ERO e prevenir convulsões em um modelo de TCE induzido por LPF (LIMA et al., 2009a; SOUZA et al., 2009). O mesmo protocolo de natação se mostrou também efetivo para limitar o dano secundário a nível cerebral e hepático, reafirmando a importância de se manter uma vida fisicamente ativa (DE CASTRO et al., 2017a). De forma terapêutica, tanto protocolos de exercícios voluntários e forçados, como na esteira e de natação, demonstram efeitos benéficos no tratamento do dano secundário (ITOH et al., 2011; JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015), apesar de existirem ainda discordâncias acerca do melhor momento para se iniciar o protocolo de exercício físico após o TCE, o que deve variar de acordo com a severidade da lesão (GRIESBACH, 2011a).

Dentro do contexto dos esportes, em uma pesquisa feita nos Estados Unidos com estudantes universitários que jogavam Futebol Americano, equipados com acelerômetros nos capacetes, foi visto que cada atleta podia sofrer até mil concussões durante uma única temporada, ocasionadas por movimentos de aceleração e desaceleração repentinos (CRISCO et al., 2011b). Dessa forma, muitas concussões ocorrem sem que o próprio indivíduo acometido saiba, continuando em campo praticando o esporte. Sendo assim, existe uma grande preocupação hoje em dia no que diz respeito ao tempo de retorno ao jogo por parte de atletas que sofreram concussão, sejam eles profissionais ou não, dado que, a ocorrência de um novo insulto traumático no encéfalo durante esse período de perturbação na homeostase celular, disfunção do metabolismo energético e fluxo sanguíneo cerebral pode levar a uma piora do quadro, agravando o dano secundário (BARKHOUDARIAN et al., 2016b). Assim, ao pesquisar na literatura fica claro que muitos dos esforços para entender a interação do exercício físico e do TCE ainda recaem na prática profilática ou terapêutica do exercício, onde ainda existem resultados controversos sobre o melhor momento para se iniciar o exercício físico após o TCE (GRIESBACH, 2011a). No contexto das concussões que ocorrem durante a prática de um esporte, existe um

desconhecimento acerca da interação da concussão com o estresse agudo ocasionado pelo exercício físico no corpo do atleta, e como isso impacta a janela de vulnerabilidade para um novo evento concussivo tanto a nível cerebral quanto a nível periférico, em órgãos como o intestino e o baço.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de concussões recorrentes associados a prática de exercício físico na comunicação entre encéfalo, baço e intestino.

#### 3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO DO CAPÍTULO I

**A)** Desenvolver um artigo de revisão do estado atual da literatura científica acerca da relação existente entre cérebro, baço e intestino na fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico, e de que forma o exercício físico pode atuar nesse eixo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO II

**A)** Determinar se nosso modelo de 10 concussões recorrentes induz a ativação de astrócitos em regiões superficiais do córtex cerebral de ratos wistar 7 dias após a última lesão;

**B)** Avaliar o estado nitrosativo e a lipoperoxidação do cólon proximal de ratos wistar submetidos a 10 concussões associadas à prática de exercício físico;

**C)** Investigar o papel do exercício físico associado a 10 concussões recorrentes na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase do cólon proximal de ratos wistar.

**D)** Avaliar o efeito de concussões recorrentes associadas a prática de exercício físico de natação sobre a expressão de Nrf2, AMPK e do receptor 5HT4R no cólon proximal de ratos wistar machos.

**E)** Investigar o efeito de um modelo de 10 concussões recorrentes marcadores do arco colinérgico antiinflamatório do baço e do cólon proximal;

**F)** Investigar se a prática concomitante de exercício físico atua na janela de vulnerabilidade ao efeito somatório de concussões no córtex, baço e cólon proximal;





## 4 CAPÍTULO I

O manuscrito a seguir corresponde ao artigo de revisão aceito (<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.006>) para publicação na revista científica “*Neuroscience and Biobehavioral Reviews*” em 08/08/2021 (Carta de Aceite da revista abaixo).

**Date:** Aug 08, 2021  
**To:** "Luis Fernando Freire Royes" nandoroyes@yahoo.com.br  
**From:** "Neuroscience and Biobehavioral Reviews" support@elsevier.com  
**Subject:** Decision on submission to Neuroscience and Biobehavioral Reviews

Manuscript Number: NEUBIOREV-D-21-00494R1

The immunological influence of physical exercise on TBI-induced pathophysiology: crosstalk between the spleen, gut, and brain.

Dear Dr Freire Royes,

Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience and Biobehavioral Reviews.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication.

My comments, and any reviewer comments, are below.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

We appreciate you submitting your manuscript to Neuroscience and Biobehavioral Reviews and hope you will consider us again for future submissions.

Kind regards,  
 Mikhail Pletnikov, MD; PhD  
 Associate Editor

Neuroscience and Biobehavioral Reviews

Editor and Reviewer comments:

More information and support

FAQ: When and how will I receive the proofs of my article?  
[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/6007/p/10592/supporthub/publishing/related/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/6007/p/10592/supporthub/publishing/related/)

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?  
[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)

For further assistance, please visit our customer service site:  
<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU\_NEUBIOREV#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/neubiorev/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

**THE IMMUNOLOGICAL INFLUENCE OF PHYSICAL EXERCISE ON TBI-INDUCED PATHOPHYSIOLOGY: CROSSTALK BETWEEN THE SPLEEN, GUT, AND BRAIN**

Douglas Buchmann Godinho<sup>a,b,#</sup>, Fernando da Silva Fiorin<sup>c,#</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>e</sup>, Ana Flavia Furian<sup>e</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>a,d</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Exercise Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Graduate Program in Neuroengineering, Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience, Santos Dumont Institute, Macaíba, RN, Brazil.

<sup>d</sup> Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica Médica e Pediatria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\* Corresponding author: Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Department of Sports Methods and Techniques

Physical Education and Sports Center

Federal University of Santa Maria,

97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Fax: +55 55 3220 8031

E-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

<sup>#</sup> The first two authors contributed equally and shared the first authorship.

All authors declare they have no competing financial conflicts of interest. All authors have read and approved the final manuscript.

## **ABSTRACT**

Traumatic Brain Injury (TBI) is a non-degenerative and non-congenital insult to the brain and is recognized as a global public health problem, with a high incidence of neurological disorders. Despite the causal relationship not being entirely known, it has been suggested that multiorgan inflammatory response involving the autonomic nervous system and the spleen-gut brain axis dysfunction exacerbate the TBI pathogenesis in the brain. Thus, applying new therapeutic tools, such as physical exercise, have been described in the literature to act on the immune modulation induced by brain injuries. However, there are caveats to consider when interpreting the effects of physical exercise on this neurological injury. Given the above, this review will highlight the main findings of the literature involving peripheral immune responses in TBI-induced neurological damage and how changes in the cellular metabolism of the spleen-gut brain axis elicited by different protocols of physical exercise alter the pathophysiology induced by this neurological injury.

**Keywords:** TBI; spleen; gut; immune system; physical exercise; inflammation; brain injury.

## 1 INTRODUCTION

Traumatic Brain Injury (TBI) is a devastating condition caused by a mechanical force on the brain, often leading to neurological disorders. Most TBI patients take months to years to recover, and a majority of individuals never fully return to pre-injury functioning and live with chronic disabilities (MAAS et al., 2017; WILSON et al., 2017). This neuronal injury affects 70 million people worldwide every year (DEWAN et al., 2018). A concussion is an interchangeable term for mild TBI and represents 80-90% of the cases (McCrorry et al., 2017). The pathophysiology of this injury is classified as primary damage (mechanical impact to the brain) and secondary damage (neurochemical consequences of the primary damage) (COLLINS-PRAINO; CORRIGAN, 2017), resulting in long-term neurological and psychiatric disorders (CHEN et al., 2007; GOLDMAN et al., 2006; HOLSINGER et al., 2002).

From a metabolic point of view, experimental studies have shown that the dysfunctional hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis after TBI disrupts the metabolic balance and increases stress hormones (TAPP et al., 2019). Together with efferent vagal output, adrenocorticotropic hormone (ACTH)-induced epinephrine and norepinephrine released by the adrenal gland promote splanchnic hypoperfusion, increasing cytokine and chemokine levels. The result of this inflammatory response can be observed in severe peripheral organs, such as the liver, heart, muscle, spleen, and gut (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019; ZHANG; JIANG, 2015a). The intestinal permeability of TBI patients suggests that changes in the correct functioning of peripheral organs affect the Central Nervous System (CNS) (MCHUGH et al., 2007), exacerbating TBI secondary damage and characterized by fatigue and learning and memory dysfunctions (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). Moreover, lymphopenia is caused, at least in part, by prolonged ventilation, surgical procedures, immunodeficiency, and extended hospitalization (WAGNER e KUMAR, 2019), in addition to affecting the recovery of CNS function (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). However, there are caveats to consider when interpreting how interactions established between peripheral immune responses are associated with the development of neurological dysfunction elicited by this injury. Understanding the mechanisms by which the brain interacts with systemic physiology along the course of the TBI pathophysiology is essential to establish scientific-based rehabilitative strategies.

One of these strategies may be to support physical exercise that facilitates endogenous repair mechanisms after experimental TBI (GRIESBACH, 2011b). The neuroprotective actions elicited by physical exercise in experimental TBI models can be evidenced in the molecular

system and associated with the control of cellular metabolism, the integrity of plasma membrane, and synaptic plasticity (DA SILVA FIORIN et al., 2016a; SILVA et al., 2013b). Recently, experimental data from our research group revealed that favorable changes in the hepatic oxidative-inflammatory status elicited by exercise exerted prophylactic effects on acute hyperglycemia and cerebral inflammatory response induced by severe TBI (DE CASTRO et al., 2017a). Physical exercise also alters the systemic inflammatory state (DA LUZ SCHEFFER; LATINI, 2020a; WALSH et al., 2011), reducing the circulating levels of pro-inflammatory cytokines and the number of neutrophils in the blood of individuals with chronic inflammation (PEDERSEN; BENTE KLARLUND; STEENBERG, 2002). Physical exercise-induced anti-inflammatory effects, as explicitly observed in lymphoid organs, may be represented by increased production of adrenaline, cortisol, and growth hormones that influence leukocyte trafficking, improve anti-inflammatory myokine levels, and diminish the expression of toll-like receptors (TLRs) in immune cells (STEWART et al., 2005a).

The hypothesis that physical exercise improves immune system functions is widely disseminated in the literature, although some aspects regarding the immunological dynamics remain controversial. While acute inflammatory responses during aerobic physical exercise produce positive effects on peripheral and CNS function (CLARK; MACH, 2017a; DA LUZ SCHEFFER; LATINI, 2020a), redox imbalance caused by excessive exercise and/or inadequate recovery has been associated with symptoms of overtraining, which are characterized by central fatigue, insomnia, weight loss, inflammation, and immunosuppression (SVENSSON et al., 2015). These contradictory statements reinforce the assumption that some exercise protocols may alter this communication and contribute to the appearance and propagation of neurological disorders (ROYES, 2020b). Furthermore, the exact role of innate and adaptive immunity is far from clear in TBI. In order to shed more light on this issue, the present review will highlight the main findings of the literature on (i) the interactions established between peripheral immune responses associated with the spleen and gut after TBI and (ii) how changes in cellular metabolism of lymphoid organs elicited by physical exercise can alter the TBI-induced pathophysiology.

## **2 NEUROINFLAMMATORY RESPONSE AFTER TBI**

Regarding the role of the immune system in TBI-induced pathophysiology, it is important to note that the activation of immune cells evolves over time, presenting beneficial and pathogenic components that explain why attempts to target immune activation broadly have not

successfully changed the clinical outcome of patients with TBI (EDWARDS et al., 2005; ROBERTS et al., 2004). The immune system is divided into two major groups: the innate system and the adaptive system. The innate system is composed of neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, natural killer cells, and soluble factors that complement the system, including acute phase proteins and enzymes that replenish stimuli in a non-specific way. On the other hand, the adaptive immune system responds to antigens in a specific way and has a memory pattern composed of T and B lymphocytes and humoral factors, such as immunoglobulin's. Notably, the elements of the innate system can act as effectors of the adaptive system (DINET et al., 2019).

In this scenario, the temporal progression of the immune response after TBI is characterized by the early release of shock proteins, damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), that bind to TLRs and purinergic receptors, inducing the immediate activation of resident myeloid cells (e.g., microglia). In addition, the formation of the inflammasome NALP1 promotes interleukin production (IL-1 $\beta$  and IL-18), which affects the internal environment and facilitates peripheral immune infiltration (CORPS et al., 2015). The presence of extravasated blood products, complement fragments, and reactive oxygen and nitrogen species are events that coincide with the activation of metabolic dysfunction associated with neuronal excitation and inhibition (DE CASTRO, MAURO ROBSON TORRES et al., 2017a; ROYES e GOMEZ-PINILLA, 2019). The mechanical and shear stress associated with TBI also activates the potential transient receptor cation (TRP receptors), leading to neuropeptiderelease and instigating a neurogenic inflammatory response (CORRIGAN et al., 2016). These events provide positive feedback that amplifies and propagates inflammation by releasing pro-inflammatory mediators, oxidative metabolites, and metalloproteinases, among others, that cause more neuronal damage after TBI (CORRIGAN et al., 2016).

Regarding TBI-induced path physiology, inflammation plays a vital role in restoring homeostasis and is the primary defense against pathogens composed of the innate (natural) and adaptive (acquired) immune system (KUMAR, A. et al., 2016; LOANE; KUMAR, 2016; MEDZHITOV, 2010). Regulatory T cells (Tregs) are important to prevent auto-immunity system hyper activation (KIM et al., 2007; ULGES et al., 2016), releasing anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) through the effects of T cells and antigen-presenting cells (HUANG et al., 2009; LIESZ et al., 2009; LIU, YAWEI et al., 2006). After TBI, a reduction in the primary defense, including monocytes and macrophages (HUBER-LANG et al., 2018), reinforces the concept that the immunosuppression

of innate and adaptive cells may be associated with the high mortality of patients in surgical intensive care (GENTILE et al., 2012).

Nevertheless, the prolonged microglial activation is strongly associated with chronic changes in neurons and characterized as reduced dendritic spine density when analyzed one year after TBI (ERTÜRK et al., 2016). Chronic TBI-induced inflammation facilitates the propagation of others injury factors, including metabolic changes, edema formation, calcium influx, increased oxidative stress, excite toxicity, and cell death via necrosis or apoptosis (CORRIGAN et al., 2016). Excessive immune response is responsible for releasing neurotoxic mediators, tissue damage (MOALEM; TRACEY, 2006), and cell barrier dysfunction through endothelial coagulation (KOTTKE; WALTERS, 2016). The innate and adaptive cells can move by chemical attraction towards the damaged region and release numerous molecules to kill invasive pathogens. These inflammatory responses are driven by innate macrophages and neutrophils recruited to the injured tissue that release many inflammatory mediators, such as cytokines (MOALEM; TRACEY, 2006).

Different stimuli also lead to changes in macrophages profile. Macrophages (M1) are pro-inflammatory and release TNF- $\alpha$  and interleukin IL-6, and subtype macrophages (M2) release anti-inflammatory interleukins, including IL-4, IL-10, and IL-13 (MOALEM; TRACEY, 2006). Another subtype of immune cells is T helper (Th) cells that differentiate in Th1 and Th2 cells and play a crucial role in the adaptive response of the immune system (NAKAYAMADA et al., 2012). Although there are other Th cell subtypes, such as Th17 (anti-inflammatory), which is involved in auto-immune diseases, Th1 and Th2 (pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms, respectively) can change the conformation to M1 (pro-inflammatory) or M2 (anti-inflammatory) macrophages (NAKAYAMADA et al., 2012). Tumor necrosis factor (TNF) is essential for macrophage activation in target organs that control Th cell proliferation (KHERA et al., 2012; RAVENEY et al., 2010). Considering that CD4<sup>+</sup> T cell lineage may release pro-inflammatory molecules from Th1 or anti-inflammatory signaling from Th2 (NAKAYAMADA et al., 2012), it is plausible that neuroinflammation can be harmful and/or beneficial depending on its state of polarization and functional responses after injury (DI BATTISTA et al., 2016).

## 2.1 CROSSTALK BETWEEN THE BRAIN AND PERIPHERAL ORGANS THROUGH THE IMMUNE SYSTEM AFTER TBI

The immune system is represented by numerous blood markers that interact with several physiological systems, organs, and tissues and change normal responses. Imbalanced immune activation is a debilitating factor that leads to poor physiological responses and consequent deficits. In this scenario, the systemic inflammation observed in the serum and plasma of TBI patients reinforces the idea that cytokines spread in the blood and act in target organs, causing a sizeable inflammatory process. After TBI, elevated interleukin levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) are observed three to six months after neuronal injury and are correlated with chemokines in the acute stage of the lesion (Table 1) (DI BATTISTA et al., 2016). Moreover, cytokines, interleukins, macrophage inflammatory protein-1-beta (MIP-1 $\beta$ ), monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1), TNF, and basic fibroblast growth factor (bFGF) remain in the plasma of patients for one year after mild brain damage (Table 1) (CHABAN et al., 2020).

Systemic inflammation can signal other organs and increase TBI damage. In this sense, some studies in the TBI field have shown efficient alterations in peripheral organs, such as the heart, liver, and lung (ANTHONY et al., 2012a; GREGORY; SMITH, 2012; LEE; RINCON, 2012; VILLAPOL, 2016). In some peripheral tissues linked to the brain, changes and/or maladaptive functions are associated with excessive inflammatory mediator release and aggravate neurological problems induced by brain damage, such as Alzheimer's disease (GIUNTA et al., 2012).

From an interactive view among brain and systemic markers, literature data point to increased acute and sub acute phases of TBI in glial fibrillary acidic proteins (GFAP) and tau and A $\beta$ 42 proteins in the plasma of patients (Table 1) (BOGOSLOVSKY et al., 2017), implying that changes in the immune system increase damage and reduce the quality of life (MCKEE e LUKENS, 2016). In fact, the inflammatory process caused by the direct impact on the brain by TBI is associated with several pathologies, such as depression and anxiety, in addition to the risk of developing neurodegenerative diseases (GOLDMAN et al., 2006; HOLSINGER et al., 2002). Acute inflammation evaluated by inflammatory biomarkers (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , soluble vascular adhesion molecule [sVCAM-1], soluble intercellular adhesion molecule [sICAM-1], and soluble Fas [sFAS]) is also predicted for the risk of post-traumatic depression in patients with moderate to severe TBI (Table 1) (JUENGST et al., 2015).



The immune system is pivotal for physiologic maintenance and repairing organs and tissues in homeostasis or after pathologies. Especially after TBI, the immune response can be a mechanism of repair or impairment depending on the severity of damage (MCKEE; LUKENS, 2016). On the other hand, due to the capacity of immune system to tissue degeneration during hyper activation, many studies have reported that therapeutic strategies may reduce immune system activation when this system is involved with TBI-induced impairment (GARCIA et al., 2017; UHLICH et al., 2020). For instance, da Silva Fiorin et al. (2020a) showed that a TBI experimental model elicited by fluid percussion injury (FPI) caused post-traumatic headache behavior in rats by active inflammatory cells in the peripheral and CNS. After experimental FPI, neuroinflammation induces dendritic spine loss, neuronal apoptosis, and microglia depletion (WANG, C.-F. et al., 2020). Despite being involved in the path physiology of TBI, it is important to note that early activation of the immune system is essential to preserve the tissue since the over expression of astrocytic cells is associated with the protection of mitochondrial function after TBI (REN et al., 2020). In different stages of TBI-induced toxicity, the glial scar blocks inflammatory signaling, suggesting that protection of the brain is dependent on a glial scar mediated by the positive regulation of astrocytic reactivity (SCHIWECK et al., 2020). In this sense, it is necessary to develop therapeutic strategies that neutralize the continuous inflammatory process.

Local inflammation in the injury site can elicit a systemic reaction that results in peripheral immune system response, causing significant damage (SERHAN; SAVILL, 2005). In the CNS, inflammatory events are commonly observed in two distinct phases (acute and chronic) after TBI. Acute events consist of a short period (24-48 h) of inflammatory mediator release, and chronic inflammation may persist for years after injury (PLESNILA, 2016). Despite the start of tissue regeneration in the acute phase after lesion, chronic action of cells in the immune system leads to systemic inflammation and additional tissue degeneration (PLESNILA, 2016; SERHAN; SAVILL, 2005). In one study, several inflammatory components were shown to activate and sustain in the pro-inflammatory state after TBI in rats (LEE et al., 2018). Furthermore, circulating leukocytes released by the initial lesion may induce damage in non-injured peripheral organs, increasing the systemic inflammatory process and damage for extended periods (BALK, 2014; PLESNILA, 2016).

Maintenance of brain and peripheral tissues after TBI can depend on anti-inflammatory molecules, including IL-10. In healthy tissues, this anti-inflammatory cytokine is essential for

vasculature maintenance by controlling oxidative stress and inflammation, protecting from deleterious effects in the vascular and endothelial systems (GARCIA et al., 2017). In a TBI experimental model, IL-10 helped reduce brain lesion volume, edema, and cognitive deficits induced by injury, with beneficial effects on cellular survival and blood-brain-barrier (BBB) integrity when associated with hyperbaric oxygen therapy (CHEN, X. et al., 2014). Soares et al. (2012) reported that treatment with IL-10 reduced damage and naturally elevated IL-10 levels are correlated with higher mortality in TBI patients (Table 1). Clinical studies have also shown that IL-10 increases within the first three hours after TBI, although this can extend for up to six months (Table 1) (CAPLAN et al., 2015; HENSLER et al., 2000; HENSLER et al., 2002), suggesting that IL-10 may be associated with the compensation of increased pro-inflammatory load, such as increased TNF- $\alpha$  (a pro-inflammatory cytokine), and estradiol in the serum of patients after severe TBI (KUMAR et al., 2020). Consequently, elevated plasma markers of pro-inflammatory cytokines and reduced anti-inflammatory markers underline the importance of an extracranial inflammatory response as a marker of disease severity in patients with severe TBI (HALL et al., 2014). However, how the immune system influences peripheral organ metabolism after TBI and peripheral path physiology exacerbates brain pathology must be further clarified.

## 2.2 THE IMPLICATIONS OF THE SPLEEN IN IMMUNOLOGICAL RESPONSES AFTER TBI

It is well known that the immunological functions of the body are responsible for controlling a wide variety of pathogens and abnormal cells (BRONTE; PITTET, 2013). In this scenario, the spleen is a crucial lymphoid organ that maintains iron metabolism and erythrocyte homeostasis and eliminates harmful antigens and pathogens (BRONTE; PITTET, 2013; LEWIS et al., 2019). As the primary mediator of the mononuclear phagocytic system, splenic leukocytes prevent infections via encapsulated bacteria and intracellular pathogens. Experimental data indicate that interactions between injected progenitor cells and resident CD4<sup>+</sup> splenocytes improved the recovery of BBB integrity, which is associated with increased anti-inflammatory cytokine IL-4 and IL-10 levels (WALKER et al., 2010). The significant reduction of the inflammatory status of the spleen and microglia after treatment with human umbilical blood T cells in an experimental TBI model suggests that the immune system of the spleen can develop compensatory responses after TBI (CAPLAN et al., 2020). In fact, Xu et al. (2017) reported that the significant increase of Tregs cells in the spleen was elicited by acute treatment with atorvastatin

attenuate infiltration of T cells, neutrophils, and natural killer cells as well as enhances M2 polarization, reducing neuronal apoptosis and improving behavioral deficits in a TBI experimental model. The significant attenuation of white matter injury and improvement of depression-like and anxiety-like behavior in rodents after experimental TBI has also been associated with reduced Th1 infiltration, while Th2 and Tregs cells increased (SEN et al., 2020). The significant association between elevated Tregs levels circulating with better neurologic recovery and lower hospital mortality suggests that early inflammation is important in the regeneration process after neuronal injury and explains why general immunosuppression in patients with TBI is disadvantageous (LI et al., 2015).

In general, neuroinflammatory responses during the acute phase of TBI have many positive attributes, and inhibition of these responses will likely enhance neural damage. This conjecture is supported by the failure of immune-dampening drugs (e.g., methylprednisolone and progesterone) in providing clinical benefits in human TBI patients when administered shortly after injury (RUSSO; MCGAVERN, 2017). Alterations in the metabolism of peripheral organs caused by suppression of the immune system also occur due to decreased F480<sup>+</sup> macrophages and Ly6Low macrophages in the spleen (Table 2) (SCHWULST et al., 2013), followed by splenomegaly and increased Ly6C<sup>+</sup> monocytes, Ly6G<sup>+</sup> neutrophils, and CD4<sup>+</sup> T cells two weeks after injury. Indeed, reduced splenic mass is associated with the release of circulating CD8<sup>+</sup> lymphocytes and damage to the BBB (Table 2) (WALKER et al., 2010), reinforcing the involvement of CD8<sup>+</sup>T cells in long-term behavioral deficits after TBI (DAGLAS et al., 2019). Recently, Uhlich and collaborators (2020) showed that immunosuppression and pneumonia after severe TBI associated with intracranial hypertension was not caused by splenic macrophages, and clinical studies have demonstrated that spleen removal can increase the risk of infections post-splenectomy, causing mortality indices to reach 70% (DE PORTO et al., 2010; NOBLE et al., 2018a).

Surprisingly, the same organ that prevents infection can also exacerbate the inflammatory response. Despite Tregs maintaining self-tolerance and regulating immune responses after TBI, experimental data have revealed that the depletion of these cells reduces motor deficits, attenuates T cell infiltration in the brain, and decreases inflammation in the damage site after TBI (KRAMER et al., 2019). Moreover, nutritional support for patients with severe TBI reduces the percentage of Treg cells in peripheral CD4<sup>+</sup> lymphocytes (JIA et al., 2018), and this may be because Treg cells have pro-inflammatory action. To better understand the immunomodulatory role of Tregs in TBI, additional research is required, including long-term studies to examine their contribution to chronic brain inflammation and associated co-morbidities.

Resident macrophages in the spleen express adrenergic/cholinergic receptors and therefore demonstrate a heightened sensitivity to changes in autonomic output (SHARKEY et al., 2019). In this scenario, the release of inflammatory cytokines of the surrounding glia stimulates the posterior hypothalamus to increase nor epinephrine production after neurological injury (AL-SADI et al., 2014; RASOULI et al., 2011; ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019; TRACEY, 2002). Increased sympathetic activity post-TBI also leads to splanchnic hypo perfusion and aberrant intestinal permeability, which are evidenced as an elevated ratio of orally ingested lactulose (a marker of paracellular permeability) to mannitol (a marker of transcellular permeability) in the urine of TBI patients (MCHUGH et al., 2007). Although the mechanism(s) underlying this TBI-induced reduction of the circulating T cell pool is unclear, Nakai and colleagues (2014) uncovered that administering  $\beta$ 2-adrenergic receptor ( $\beta$ 2AR) agonists significantly reduced the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> blood cells, revealing that a lymphopenia resulting from  $\beta$ 2AR stimulation also inhibited the lymphocyte liver (NAKAI et al., 2014). Thus, the present report proposed several harmful and beneficial signaling pathways in the spleen, gut, and brain after TBI (Figure 1).

Another critical research line involved in TBI-induced physiopathology is the cholinergic system. The immunosuppression caused by a reduction in pro-inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1, and high mobility group box-1 (HMGB-1) can be induced by activation of cholinergic pathway vagal stimulation in splenic macrophages (MARTELLI et al., 2014; UHLICH et al., 2020). The depletion in the expression of CD11 integrins after splenectomy also reinforces the idea that vagal nerve stimulation (VNS) modulates the systemic inflammatory response after TBI (HALL et al., 2014). Hence, an increase in vagal tone directly induced by a neuronal injury or high intracranial pressure may lead to immune suppression, increasing infection susceptibility of the hospitalized patient with TBI (KAWAHARA et al., 2003). However, it is worth noting that although plausible, no clinical study has investigated the role of parasympathetic signaling in mediating the higher incidence of infection in patients with TBI. Furthermore, understanding post-injury vagal deregulation is crucial to establish scientific-based rehabilitative strategies that reduce the mortality attributed to infection and the long-term effects of infection regarding poor neurological outcome in TBI patients.

### 3 THE IMMUNE CONNECTION BETWEEN THE BRAIN-GUT-SPLEEN AXIS AFTER TBI

In homeostasis, the bidirectional communication between the central and enteric nervous system (ENS) is crucial for modulating gastrointestinal functions such as motility, secretion, blood flow, intestinal permeability, mucosal immune activity, and visceral sensation, including pain (RHEE et al., 2009). Growing evidence shows that the gut is a major bidirectional communicator between the brain and gastrointestinal system (ZHANG et al., 2021). The gut is a secondary lymphoid organ that contains ~70-80% of the immune cells in the body (YOO; MAZMANIAN, 2017), 100 million neurons that compose the ENS, and microbiota with approximately  $3 \times 10^{13}$  bacterial cells (SENDER et al., 2016) with an effective immune response (POWELL, N. et al., 2017a). Consequently, functional and structural damage to the gut after TBI has been demonstrated both in humans and experimental models (KHARRAZIAN, 2015a; URBAN et al., 2020).

Although the exact mechanism of intestinal permeability after TBI is unknown, an increasing line of evidence allows us to think that the spleen plays a role in the brain-gut interaction and behavioral outcomes by producing metabolites and immune factors. In this sense, splenic mass reduction after brain injury increases the number of immune cells in the circulation (DAS et al., 2011). Since sepsis response to TBI is reflected in the subsequent increase of systemic inflammatory response and organ failure (BANSAL et al., 2009), elevated TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels elicited by splanchnic dysfunction may affect tight junction permeability in the intestine (AL-SADI et al., 2014). In fact, TBI-induced inflammatory events, together with decreased myosin light chain kinase expression, induce dysfunctional contractility of the smooth muscle within the gastrointestinal tract (SUN et al., 2015).

The dysfunction in the colon mucosal barrier develops over time after neuronal injury and reduces claudin-1 expression and increases sub epithelial enteric glial cell activation, which regulates mucosal barrier homeostasis (MA et al., 2017b). Interestingly, these alterations have been associated with inflammatory and degenerative processes in the injured cerebral cortex (MA et al., 2017b). In addition, reduced intestinal contractile activity was observed in TBI patients and mucosa damage and permeability in the small intestine of rats up to 72 h after an injury is mediated by adrenergic system hyperactivity (HANG et al., 2003b; SUNDMAN et al., 2017a). Noradrenergic neurons in the ENS can act through  $\beta$ 2AR on macrophages supporting differentiation towards the M2 phenotype and T cells, favoring TH2 and TH17 differentiation and limiting T helper (TH)1 differentiation (POWELL et al., 2017b). Nevertheless, the nor

adrenaline release from the autonomic nervous system (ANS) can impair mucoprotein production and goblet cell numbers in the gut after brain injury, jeopardizing intestinal wall integrity (HOULDEN et al., 2016a).

Besides increasing the permeability of tight junction in the intestine, TBI-induced dysbiosis and microbial translocation expose the immune system to DAMPs and PAMP (HANSCOM et al., 2021b; KHARRAZIAN, 2015a), that are molecular signals detected by the coagulation systems that induce intracellular signaling in leukocytes via pattern recognition receptors (PRRs) (ARRIETA et al., 2006). The systemic immune response has been associated with inflammatory and degenerative processes in the injured brain since bacterial cell wall products (LPS) may trigger TLRs expressed by microglial cells in the CNS (POWELL et al., 2017a). Additionally, Benakis et al. (2016) demonstrated that after a brain injury induced by an experimental cerebral artery occlusion model, intestinal  $\gamma\delta$  T cells could move to the brain, where they propagated a pro-inflammatory status that exacerbated tissue damage. Moreover, gut-derived lymph factors appear to reach the systemic circulation and initiate a sequence of events that lead to apoptosis of splenic immune cells through TLR4 signaling in trauma-hemorrhagic shock (TIESI et al., 2013a), impairing the immune body response.

Another pathway connected in the brain-gut-spleen axis after TBI is the cholinergic anti-inflammatory reflex. Although it does not innervate the spleen, its stimulation produces immunoregulatory effects through acetylcholine (ACh) receptors (AChR) (BOROVIKOVA et al., 2000; HUSTON et al., 2006; ROSAS-BALLINA et al., 2008). It is important to note that the vagus nerve carries sensory information from visceral organs. Consequently, inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, and prostaglandins potently activate vagal afferent fibers (EK et al., 1998). Experimental data have demonstrated that vagus fibers can be activated by intestinal microbes when the body encounters various harmful events such as TBI (GHIA et al., 2006; KIMURA et al., 2019b). In response to this activation, the release of efferent vagal ACh in the celiac ganglion sends noradrenergic signals to the spleen through the splenic nerve (CHAVAN et al., 2017), producing ACh by the spleen's T cells. Furthermore, direct vagal communication between the ENS and CNS has been experimentally proven (COSTANTINI et al., 2012; THE et al., 2011), and even the activation of 5-hydroxytryptamine 4 receptors (5-HT4R) in the my enteric plexus stimulates cholinergic motor neurons to produce ACh (AGRAWAL et al., 2020; MATTEOLI et al., 2014; TSUCHIDA et al., 2011), thus presenting local cholinergic anti-inflammatory response through  $\alpha 7nAChR$  in macrophages and muscarinic acetylcholine receptor M2 (M2AChR) in neutrophils (KIMURA et al., 2019a).

In this sense, the activation of nicotinic ACh receptors (nAChR) in macrophages in the spleen or gut induces the suppression of pro-inflammatory cytokine production via Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2-STAT-3), thereby inhibiting the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB (NF-kB). These experimental data suggest that VNS after TBI promotes ACh release by efferent vagus nerves to inhibit TNF- $\alpha$  production via AChR-expressing immune cells (WAZEA et al., 2018). In this line of thinking, the induction of colitis with dextran sulfate sodium (DSS) 28 days after a mild (sham craniotomy) and a moderate-severe TBI caused systemic inflammation and exacerbated post-traumatic neuroinflammation, which may be explained by the decreased vagal tone only seen in the TBI/craniotomy+DSS groups (HANSCOM, M. et al., 2021a).

It is well known that TBI compromises systemic physiology, including organ function with subsequent metabolism dysfunctions, and a much more detailed review focused solely on the brain-gut axis is beyond the scope of this article and has already been revised by Hanscom et al. (2021) (HANSCOM et al., 2021b). Although the immune system interconnects the spleen-gut-brain axis and exacerbates TBI-induced physiopathology (Figure 2), a better understanding of this cross-talk is necessary to develop a new therapeutic approach, and one possible strategy may be physical exercises. Cross-sectional studies have demonstrated that regular physical exercises protect against diseases associated with chronic low-grade systemic inflammation (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

## **4 THE EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE IN THE SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE IMMUNE RESPONSE**

### **4.1 GENERAL ADAPTATION ELICITED BY PHYSICAL EXERCISE**

There is a consensus that performing physical exercises is a health-improving tool that acts as a non-pharmacological intervention in numerous diseases (BUDDE et al., 2016; CASPERSEN et al., 1985). According to the American College of Sports Medicine (ACSM), activities ranging from 40 to 59% of maximum oxygen consumption (VO<sub>2</sub>max) are considered to be of moderate intensity, while activities ranging from 60 to 84% of VO<sub>2</sub>max are considered to be of high intensity. The ACSM also suggests at least 150 min per week of moderate-intensity exercise or at least 75 min per week of vigorous-intensity aerobic physical activity to improve the health of individuals affected by chronic diseases (Physical activity guidelines for Americans, 2008). Notably, given COVID-19 restrictive measures, there has been a reduction

in physical exercises and activities (AMMAR et al., 2020; BENTLAGE et al., 2020). In this scenario, a new statement by the ACSM recommended 150-300 min per week of physical activity or sports to maintain immune health and at moderate to vigorous intensity (Read ACSM's first Call to Action Statement published in Current Sports Medicine Reports: COVID-19: Considerations for Sports and Physical (DENAY et al., 2020)). According to the International Society for Exercise and Immunology (ISEI), immune dysfunction may occur after continuous and prolonged exercise (>1.5h) performed at moderate to high intensities (55-75% of  $VO_2max$ ) (WALSH et al., 2011).

Recent clinical and experimental studies have described that the effects of acute physical exercise generate a stress response in the body due to high energy demand, increase heart rates, reactive oxygen and nitrogen species generation, catecholamine release, and transient tissue redistribution of immune cells (PEAKE et al., 2017). The activation of intracellular signaling by regulators of epigenetic and transcription factors induces an adaptive cellular response in physical exercise (HAWLEY et al., 2014; MCGEE; HARGREAVES, 2020). In addition, the controlled repetition of physical exercise, through periods of recovery and performance control, may cause protective responses to the stress induced by an acute session of exercise and become chronic adaptation. Changes and adaptations to new exercise sessions occur in various organs and tissues, including the gut and spleen (GAVRILOVIĆ et al., 2012; LIU, YAN et al., 2020; PILLON BARCELOS et al., 2017; RADAK et al., 2016). Some of the general beneficial metabolic effects induced by exercise that modulate the immune system include (Figure 3):

(I) reduced white adipose tissue (WAT) due to the energy demand during exercise, and it is well established that this is one way to diminish the pro-inflammatory state since the WATs actively produce TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, leptin, and retinol-binding protein-4 (GIELEN et al., 2005).

(II) Decreased cell-surface expression of TLRs on immune cells (STEWART, L. K. et al., 2005b). These receptors play a central role in neuroinflammation and are implicated in other neurodegenerative diseases (POWELL, N. et al., 2017a).

(III) Myokine release, including IL-6, IL-15, and iris in, which are produced by contracting skeletal muscle. In fact, there are modest increases in IL-6 levels after low/moderate-intensity exercise (FISCHER, 2006), while the muscle and blood IL-6 levels increase about 100-fold in long-term physical exercise. The action of these mediators in blood mononuclear cells possibly controls exacerbated inflammation in athletes (SCHEFFER; LATINI, 2020).

(IV) Stress hormones such as adrenaline, nor adrenaline, and cortisol produced by the adrenal glands and released during exercise. These factors increase during exercise and return



to basal values shortly after, although they may also affect immune cells during the recovery period. Adrenaline and nor adrenaline act primarily on the  $\beta$ -adrenoceptors present in skeletal muscle fibers, WATs, natural killer cells, T-cells, neutrophils, and macrophages. Notably, the sympathetic nervous system is a key regulator of splenic leukocyte development and function, and norepinephrine from sympathetic nerve endings in the spleen binds  $\beta_2$  adrenergic receptors ( $\beta_2$ -ARs) to macrophages, suppressing TNF $\alpha$  production (NOBLE, B. T. et al., 2018a).

Concerning systemic adaptations elicited by physical exercise, cross-sectional studies have suggested that regularly doing physical exercises protects against diseases associated with chronic low-grade systemic inflammation (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Aerobic exercise is effective in reducing food intake in animals fed a fructose-rich diet by reducing inflammatory pathways triggered through c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) phosphorylation and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation in the liver and skeletal muscle (BOTEZELLI et al., 2016). Nevertheless, situations caused by strenuous physical exercise favor exercise-induced muscle damage, gut-derived LPS translocation, and immune cell expansion (leukocytosis). The alteration in the brain-gut-spleen connection can be observed by the translocation of intestinal-derived lip polysaccharide (LPS) and cell expansion (leukocytosis) through the BBB, altering the dopaminergic system and leading to cognitive dysfunctions and central fatigue (PROSCHINGER; FREESE, 2019).

#### 4.2 RESPONSE OF THE BRAIN-GUT-SPLEEN AXIS TO STRESS CAUSED BY STRENUOUS PHYSICAL EXERCISES

Prolonged high-intensity exercise characterized by 70% of VO<sub>2</sub>max or strenuous physical training (>90% of VO<sub>2</sub>max) promotes a pro-inflammatory state followed by a weakened immune system (LINDSAY et al., 2015; MALIN et al., 2013). As an example of the detrimental effects of strenuous physical training, elite endurance athletes during intensive training periods have a higher frequency of upper respiratory tract infections (URTI) (WALSH et al., 2011), and Roca et al.(2019) observed a similar event in amateur runners after a marathon(ROCA et al., 2019).

Although the effects of exercise intensity on spleen composition and functionality remain uncertain, it is crucial to consider that the spleen contains not only a reserve of red cells but around 40% of the body's reserve of leucocytes and as many as one third of the body's platelets (SHEPHARD, 2015). During intensive exercise, active contraction of the spleen con-

tributes with a substantial addition to total blood volume and lymphocytosis and events associated with a substantial release of catecholamine (GRAFF et al., 2018; KAPPEL et al., 1991) and immune cells (spleen and intestinal Peyer's patches) (CAMPBELL et al., 2009; KRUGER et al., 2008; KRUGER; MOOREN, 2007). In addition, the redistribution of effector cells between the blood compartment and peripheral tissues during strenuous physical exercise is mediated by increased hemodynamics and glucocorticoid release after the activation of the sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis (SIMPSON et al., 2015). The response of polymorph nuclear neutrophils observed hours after vigorous physical exercise results from the mobilization of bone marrow cells in response to elevated plasma cortisol levels (MACKINNON et al., 1997). During strenuous physical exercise, muscle fiber activation increases the release of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), leading to pro-inflammatory cytokine synthesis, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which regulate the expression of selections by the endothelial cells that attract circulating neutrophils to the muscle fiber. The IL-6 and IL-8 cytokines are secreted after tissue damage and stimulate the signaling pathway that activates NADPH-oxidase, causing the release of ROS (BRICKSON et al., 2003).

Intensive training and exhausting exercise also impair innate immunity, particularly the phagocytic and natural killer (NK) cytotoxic activities and macrophage cytokine secretion. The secondary lymphopenia observed after intense exercise seems to be due to lower Th lymphocyte counts through a redistribution of the cells in the non-lymphoid and lymphoid organs (KRÜGER et al., 2008). Clinical and experimental studies have shown that impaired T-cell, NK-cell, and neutrophil function elicited by exhausting exercise alters the Type I and Type II cytokine balance and decrease immune responses to primary and recall antigens *in vivo*. As previously described, elite athletes frequently report symptoms associated with URTI during heavy training periods and competition that may be due to alterations in mucosal immunity, particularly reductions in secretory immunoglobulin A (WALSH; OLIVER, 2016).

Furthermore, pre-competition athletes have also reported intestinal disturbance induced by HPA axis hyperactivation, and this may also occur when physical exercise exceeds 70% of  $\text{VO}_2\text{max}$ , reinforcing the relation that psychological and physical stress directly impacts the gut-brain axis (DALTON et al., 2019a; VAN WIJCK et al., 2012). Strenuous or prolonged physical exercise also reduces gastrointestinal blood flow, increasing endotoxinsusceptibility and consequent intestinal inflammatory response (CLARK; MACH, 2017b; VAN WIJCK et al., 2012). It is not a coincidence that the gut, together with the lungs, is one of the most susceptible organs to infection after physical exercise (CAMPBELL; TURNER, 2018). In fact, the lymphopenia observed in elite cyclists after strenuous exercise (pedaling for two hours in the

90% cycle of the second ventilatory threshold (TV2) reported by Kakanis et al. (2010) (KAKANIS et al., 2010) represents a period of immunosuppression and mobilization of these cells in these organs susceptible after being mobilized into the bloodstream during exercise (CAMPBELL; TURNER, 2018). More recently, repetitive sessions of exhaustive exercise on a treadmill (initial speed of 12 m/min, increasing at a rate of 3 m/min every 5 min to a maximum speed of 27 m/min in four consecutive days) in Sprague-Dawley rats led to intestinal barrier dysfunction, permitting the entry of DAMPs and PAMPs from the microbiota. The increase in these pathogens in the CNS perpetuates an inflammatory response, contributing to fatigue as well as learning and memory dysfunctions (LIAO et al., 2020).

After intense exercise, the degree of gut permeability has been measured by LPS levels in the plasma and related to fatigue. Moreover, LPS is a fragment of the outer membrane of gram-negative bacteria and is known as a PAMP capable of activating TLR in the periphery and brain microglia when injected locally (FENN et al., 2014). After an ultra marathon, 81% of the athletes were endotoxic (LPS levels >0.1 ng/ml), and 2% had a potentially lethal concentration of LPS (1 ng/ml) (BROCK-UTNE et al., 1988). Nonetheless, experimental studies have demonstrated that three weeks of moderate aerobic exercise (running on a treadmill five times/week at a speed of 16.5 m/min) prevented the excessive activation of the immune system induced by LPS injection in mice (SCHEFFER et al., 2019). Likewise, one week of exercise on a treadmill can also influence the immune response in splenocytes challenged with lip polysaccharide, decreasing pro-inflammatory cytokine secretion and suppressing TLR4 expression and NF- $\kappa$ B phosphorylation in the spleen (CHEN et al., 2016). These molecular changes in the functioning of the spleen induced by physical training may explain how athletes manage to sustain physical performance during intense physical exercise sessions (PROSCHINGER; REESE, 2019).

The exercise-induced and intensity-dependent increased inflammatory state is characterized by high amounts of circulating LPS, DAMPs (e.g., heat shock proteins (HSPs), IL-1 $\beta$ , IL-6, and ROS-damaged immune cells. Considering that pro inflammatory cytokines induce changes in behavior during acute infection by provoking feelings of fatigue, it is plausible that the significant rise in circulating proinflammatory signals during prolonged strenuous exercise also contributes to exercise-induced fatigue. In this regard, the pro inflammatory signals cross the BBB and stimulate brain microglia/macrophages through the TLR-4 and IL-1 $\beta$  receptors. In the striatum, the activation of these receptors increases the negative regulation of dopaminergic neurotransmission, leading to a decline in neuromuscular activation and fatigue (PROSCHINGER; FREESE, 2019). High cytokine synthesis rates are known to cause high

energy turnover in immune system cells, and with that, more significant energy needs (STRAUB, 2014). Consequently, the energy substrates can be moved from the neurons of these cells to maintain their activity. Therefore, during strenuous physical exercise, the increasing neuronal and microglial energy turnover induces adenosine nucleoside generation, which negatively mediates exercise performance in a concentration-dependent manner by inhibiting dopaminergic firing in the striatum (HILLION et al., 2002; ZHENG et al., 2016).

#### **4.2.1 Moderate/chronic physical exercise**

From an immunological point of view, physical exercise guides the immune system to favor an anti-inflammatory state, which seems to be the key factor in improving health, especially in chronic diseases (SCHEFFER; LATINI, 2020). Positive responses to aerobic physical exercise are identified in splenocytes and characterized by an attenuation of the inflammatory response by inhibiting TNF- $\alpha$ , IL-6, and nitric oxide (CHEN et al., 2016). Likewise, experimental data have shown that aerobic exercise (one-hour swimming) attenuates serum TNF levels by inhibiting its production in the spleen through a mechanism mediated by the subdiaphragmatic vagus nerve (SHIMOJO et al., 2019). Furthermore, optimal lymphocyte proliferation elicited by an appropriate amount of ROS after ten weeks of endurance swimming training protects against proliferative lymphocyte responses after acute physical exercise (KWAK et al., 2005). Since the immunosuppression of innate and adaptive cells may be associated with the highest mortality in TBI patients (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019), changes in the functioning of peripheral organs such as the spleen induced by physical exercise must be considered when approaching the complexity of TBI-induced brain-intestine-spleen axis dysfunction.

It is well known that the normal production of neurotransmitters and short-chain fatty acids (SCFAs) are associated with gut microbiota diversity and a healthy gut-brain axis (GUBERT et al., 2020). In this scenario, the increase in the diversity of microbiota and pathogenic bacterial communities elicited by aerobic physical exercise control damage in neuronal diseases (ROYES, 2020b). For instance, mice submitted to treadmill running protocol (ten cycles of 6 min, 4 min at high intensity, and 2 min at low intensity for 2 weeks) showed higher antioxidant defenses, improved anti-inflammatory system performance, fewer pro-apoptotic proteins in intestinal lymphocytes, decelerated biomarker progress (e.g., amyloid- $\beta$ 1-42, total tau, and phosphorylated tau), and cognitive deterioration prediction (ABRAHAM et al., 2019). The microbiota can also shape the performance through a muscle-gut-microbiota axis. This

assumption is based on the fact that transplanting fecal microbiota from human marathon runners to mice improved their running performance, where SCFA produced by a specific intestinal bacterium (*Veillonellaatypica*) serves as fuel not only for intestinal cells but also for muscles during physical exercise (SCHEIMAN et al., 2019).

From a metabolic perspective, the enriched profiles of SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) observed in athletes provide nutrients to brain microglia, establishing a link between functional gut byproducts and healthy behaviors (ERNY; PRINZ, 2017). During aerobic physical exercise, the microbiome also influences mitochondrial function and regulates their energy production, redox balance, and immunological reactions via molecular events that regulate mitochondrial biogenesis such as SCFA, Sirtuin-1, AMP-activated protein kinase, and 1-alpha gamma receptor activator activated by peroxisome proliferator (PGC-1 $\alpha$ ) (CLARK; MACH, 2017b). The cross-talk between the intestinal microbiota and mitochondria function can be evidenced by the relationship between modulation of the intestinal barrier function and the mucosal immune response with exercise-induced mitochondrial biogenesis (CERDA et al., 2016; DALTON, A. et al., 2019a). The SCFAs produced by spore-forming bacteria of the gut during endurance physical exercise regulate mitochondrial inflammation, intestinal barrier ROS production, and LPS translocation. The up-regulation of tight junction proteins and down-regulation of TNF $\alpha$  in enterocytes elicited by bacteria-derived indole-3-propionate during endurance exercise prevent the translocation of pathogens and reduce inflammatory responses (DALTON et al., 2019a; GREEN et al., 2011; RADAK et al., 2019). This is corroborated by Kim et al. (2014), who reported that SCFA-producing bacteria stimulate Treg cell expansion and differentiation.

The benefits of physical exercise on gut health can also manifest through the regulation of tryptophan (5-HTprecursor) metabolism. Aerobic physical exercise increases the muscular expression of PGC1 $\alpha$ -dependent kynurenine aminotransferase (KAT), which is responsible for converting neurotoxic kynurenine (KYN) to kynurenicacid (KYNA) in the tryptophan metabolism. Since KYNA is a metabolite unable to cross the BBB, a plasma reduction of KYN elicited by aerobic physical training protects the brain from stress-induced changes associated with depression (AGUDELO et al., 2014). Furthermore, aerobic physical exercise-induced diversification on gut microbiota characterized by *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophile*, *Morganella morganii*, and *Klebsiella pneumonia* increase tryptophan hydroxylase-1up-regulation. Besides synthesizing serotonin, the tryptophan hydroxylase-1can decrease KYN production and protect against symptoms of anxiety and depression (MICHELI et al., 2018).

It is well known that exercise has numerous effects on the human body, including the immune system. However, it is important to note that changes in metabolism, physical capacity, and gut microbiota composition among athletes and non-athletes should be observed when analyzing the response of the brain-gut-spleen axis to stress caused by physical exercises (BARTON et al., 2018). For example: Although elite athletes are not clinically immune-deficient, the incidence of symptoms of upper respiratory tract illness is increased in the days following prolonged strenuous endurance events due to the temporary exercise-induced depression of immune function (ROCA et al., 2019; WALSH et al., 2011). Nevertheless, higher levels of habitual physical activity are associated with lower inflammatory cytokine production stimulated by mitogens, lower inflammatory protein content in skeletal muscle, and lower adipokine production (GLEESON, 2007; MARTIN-CORDERO et al., 2009; PEDERSEN; BENTE; FEBBRAIO, 2012). Thus, despite the stress of exercise altering immune function, it may not be entirely harmful since reduced immune activation and subsequent inflammation are mechanisms by which regular exercise benefits long-term health.

Despite the benefits of sports to individuals' health being a well-described concept, an imbalance of organic homeostasis induced by physical exercise leads to reorganization responses in different systems, including the immune system. From a metabolic point of view, regular moderate-intensity exercise improves the responsiveness of the immune system and favors an anti-inflammatory state, which appears to be a critical factor in improving health, especially in chronic diseases (Figure 4).

#### **4.2.2 Physical exercise as a non-pharmacological intervention to treat TBI-induced psychopathology**

There are currently clear indications that physical exercise has important effects on the health of the human brain, improving various brain conditions (RADAK et al., 2016). The evidence accumulated over the years shows that regular exercise has a broad range of beneficial effects on the body, including an improved immune system and influencing the incidence of various neurological diseases (ROYES; CASSOL, 2016; LI et al., 2020b). Moreover, aerobic exercise can influence healthy food habits in young adults, as demonstrated after fifteen weeks. Prolonged duration of exercise sessions and higher intensity were associated with the decreased choice of processed and fried foods and increased intake of low-fat foods, fruits, and vegetables in the diet (JOO et al., 2019). Given this context, it is paramount to note that the change of habits promoted by the regular practice of physical exercise may also act as a synergistic factor

in the axis studied in this review, since the changes in the dietary pattern can influence the composition and, as a result, gut micro biota functionality (GUBERT et al., 2020). Furthermore, a high dietary intake of sugars and saturated fat has been linked to Bacteroidetes expression and decreased Firmicutes levels in humans and preclinical models (TURNBAUGH et al., 2009). Such findings are the opposite to physical exercise effects on microbiota composition (DALTON, ALYSSA et al., 2019b; KANG et al., 2014).

Specifically, in TBI, systematic reviews and meta-analyses have provided compelling evidence that, together with overconsumption of high-calorie diets, the lack of physical activity is considered a common problem faced by TBI patients in the sub acute and early chronic phases of injury (OUELLET et al., 2016; ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). Experimental data from our research group revealed that hyperglycemia in sedentary animals leads to a reduction in immune and bioenergetic functions, resulting in inflammation and increased susceptibility to infections after TBI (DE CASTRO et al., 2017a). These data corroborate the idea that metabolic diseases caused by a sedentary lifestyle can affect brain function and increase TBI-induced toxicity.

In this scenario, approaches that neutralize and/or mitigate secondary damage after TBI, such as physical training, may have therapeutic potential (ARCHER, 2012; GRIESBACH, 2011b). Clinical findings have revealed that physical exercise positively influences community integration, mood, and the quality of life of patients with TBI since it reduces depressive symptoms and positively affects cognitive function after TBI (PERRY et al., 2020), especially in the chronic phases of recovery (MORRIS et al., 2017; VANDERBEKEN; KERCKHOFS, 2017).

In the experimental model of FPI-induced TBI, previous aerobic swimming training with a workload of 5% of body weight (one hour/day; five days/week; for six weeks) modulates oxidative-inflammatory functions and thus delays or even prevents secondary cascades that lead to several disabilities after a TBI (DA SILVA FIORIN et al., 2016a; DE CASTRO et al., 2017a; LIMA et al., 2009b). Likewise, controlled treadmill protocol (progressive speed of 2 to 15 m/min) for four weeks also protects against inflammatory/oxidative stress and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition, which are events that contribute to the excitability of injured tissue and post-traumatic epilepsy development in this TBI model (SILVA et al., 2013b).

As previously described, physical exercise improves the functions of the immune system (DA LUZ SCHEFFER; LATINI, 2020a; WALSH et al., 2011), reducing the circulating levels of pro-inflammatory cytokines and the number of neutrophils in the blood of individuals

with chronic inflammation. Nonetheless, how an immunological modulation induced by physical training can represent a non-pharmacological therapeutic approach to control secondary injuries related to TBI is not yet fully understood. Considering that TBI is a condition that affects the BBB and decreases the immune defense system (WEI et al., 2020), care must be taken to avoid interfering with the increased metabolic demand associated with injuries since premature post-injury exercise can exacerbate post-injury symptomatology. In fact, clinical studies have demonstrated that injured athletes returning to the game early and/or professionals who participate in contact sports involving repetitive brain trauma can exacerbate the pathology in the course of the first injury (KARLIN, 2011; PFISTER et al., 2016). These recurrent injuries have generated significant concern among health professionals since, in most cases, concussions are not visible and not reported by the athlete (HAIDER et al., 2021). However, if the intensity of the exercise and window of physical activity initiation after injury are not well organized, the brain may be exposed to peripheral cytokines, PAMPs, and immune cells, which subsequently activate microglial cells and promote neurotoxicity (KLEIN et al., 2017). Considering that injury-induced alterations in the metabolism affect synaptic plasticity and exercise places an energy demand on the body (DA SILVA FIORIN et al., 2016a), the severity of the injury may prolong a period of non-responsiveness to physiological activation. These changes can limit energy in such a way that protein synthesis and intracellular signaling are compromised (GRIESBACH, 2011b; PIAO et al., 2013).

It seems to be clear that physical activity in individuals with TBI is a new area of investigation in which theories for understanding behavior should also be part of future research. In this context, animal models represent a great opportunity to investigate new and controversial effects of physical exercise in different TBI models. For instance: while some authors reveal that early voluntary physical exercise (four days after neuronal injury) reverses the memory deficit and attenuates the loss of adult neurons (JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015), others show that late voluntary physical exercise (five weeks after neuronal injury) protects against TBI-induced memory deficits (PIAO et al., 2013). The reasons for these divergences are not yet known, although it is plausible to propose that some neuronal targets implicated in physical exercise action may be influenced by the dynamic nature of this neurological injury. Thus, further preclinical research is required to establish the most appropriate exercise parameters and define a gold standard exercise regime for TBI patients.

Although an exercise regimen for humans may not be the most effective pre-treatment because injuries cannot be predicted, a considerable body of experimental evidence supports the idea that physical training may exert prophylactic effects on brain damage after neuronal



injury (ROYE; GOMEZ-PINILLA, 2019). In a TBI experimental model, previous swimming training (5% of body weight) led to lower initial damage and limited long-term secondary degeneration, supporting neural repair or behavioral compensation after neuronal injury (DA SILVA FIORIN et al., 2016a; LIMA et al., 2009b). Changes in the profile of cerebral anti-inflammatory status elicited by four weeks of aerobic physical training (24/26 m/min; one hour/day; five days/week) exerted prophylactic effects on the TBI-induced inflammatory response characterized by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, myeloperoxidase activity, and BBB breakdown increase (MOTA et al., 2012). Notably, the protocols of aerobic physical training described previously were based on 80-90% of lactate threshold (LT). These aerobic physical exercises increased the animals' aerobic resistance by stabilizing the blood lactate concentration. From a metabolic point of view, experimental data from our group indicate that early inflammatory response and oxidative stress elicited by TBI are implicated in the signal transduction that alters redox status, mitochondrial function, and insulin signaling in the liver (DE CASTRO et al., 2017a). The same study also revealed that favorable changes in the hepatic anti-inflammatory status induced by previous exercise exerted prophylactic effects on the neurobehavioral disability and long-term cell damage after TBI (DE CASTRO et al., 2017a). These experimental trials corroborate the idea that, mechanisms by which the brain interacts with systemic physiology along the course of the TBI path physiology are essential to establish scientific-based rehabilitative strategies. Understanding how peripheral changes exerted by physical exercise may be involved in neuroprotection will contribute to successfully using exercise as a therapeutic tool in this neuronal injury.

## 5 CONCLUSIONS

Traumatic brain injury is a devastating condition frequently followed by significant behavioral disabilities where the systemic response may be involved in secondary damage to the CNS. In this scenario, the immune connection between the brain-gut-spleen axis after TBI plays a vital role in behavioral outcomes by producing immune factors that may exacerbate the secondary damage after neuronal injury. Understanding the cross-talk between the brain and peripheral organs through the immune system described in this review will provide important information required to develop new and more effective therapeutic strategies against TBI-induced neurodegeneration. One of these strategies may be to support physical exercise, and the relevance of this activity in bidirectionality between the peripheral and CNS may explain, at least in part, why some exercise protocols reduce TBI-induced secondary damage.

The same molecular mechanisms involved with the positive actions of exercise are also clearly part of the molecular machinery underlying cognitive recovery after TBI by increasing antioxidant defenses (MARQUES-ALEIXO et al., 2012), promoting mitochondrial biogenesis (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019), and up regulating *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Nevertheless, it is important to note that inappropriate post-injury time window and different physical exercise protocols may alter this concept and exacerbate TBI-physiopathology. Therefore, a better understanding of the mechanisms involved in neuroprotection induced by this non-pharmacological intervention will improve guidelines for successfully using exercise as a therapeutic tool.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 307382/2017-6 for LFR). We would also like to thank Atlas Assessoria Linguística for providing support with the English version of this manuscript.

## REFERENCES

2008. Physical activity guidelines for Americans. *Okla Nurse* 53, 25.

Abraham, D., Feher, J., Scuderi, G.L., Szabo, D., Dobolyi, A., Cservenak, M., Juhasz, J., Ligeti, B., Pongor, S., Gomez-Cabrera, M.C., 2019. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: role of microbiome. *Experimental gerontology* 115, 122-131.

Agrawal, L., Korkutata, M., Vimal, S.K., Yadav, M.K., Bhattacharyya, S., Shiga, T., 2020. Therapeutic potential of serotonin 4 receptor for chronic depression and its associated comorbidity in the gut. *Neuropharmacology* 166, 107969.

Agudelo, L. Z., Femenía, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Goiny, M., Martinez-Redondo, V., Correia, J.C., Izadi, M., Bhat, M., Schuppe-Koistinen, I., 2014. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159, 33-45.

Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L., Ma, T.Y., 2014. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One* 9, e85345.

Ammar, A., Brach, M., Trabelsi, K., Chtourou, H., Boukhris, O., Masmoudi, L., Bouaziz, B., Bentlage, E., How, D., Ahmed, M., 2020. Effects of COVID-19 home confinement on eating behaviour and physical activity: results of the ECLB-COVID19 international online survey. *Nutrients* 12, 1583.

- Anthony, D. C., Couch, Y., Losey, P., Evans, M.C., 2012. The systemic response to brain injury and disease. *Brain, behavior, and immunity* 26, 534-540.
- Archer, T., 2012. Influence of physical exercise on traumatic brain injury deficits: scaffolding effect. *Neurotoxicity research* 21, 418-434.
- Arrieta, M. C., Bistritz, L., Meddings, J., 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512-1520.
- Balk, R. A., 2014. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence* 5, 20-26.
- Bansal, V., Costantini, T., Kroll, L., Peterson, C., Loomis, W., Eliceiri, B., Baird, A., Wolf, P., Coimbra, R., 2009. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis. *J Neurotrauma* 26, 1353-1359.
- Barton, W., Penney, N. C., Cronin, O., Garcia-Perez, I., Molloy, M. G., Holmes, E., Shanahan, F., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., 2018. The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut* 67, 625-633.
- Bentlage, E., Ammar, A., How, D., Ahmed, M., Trabelsi, K., Chtourou, H., Brach, M., 2020. Practical recommendations for maintaining active lifestyle during the COVID-19 pandemic: a systematic literature review. *International journal of environmental research and public health* 17, 6265.
- Bogoslovsky, T., Wilson, D., Chen, Y., Hanlon, D., Gill, J., Jeromin, A., Song, L., Moore, C., Gong, Y., Kenney, K., 2017. Increases of plasma levels of glial fibrillary acidic protein, tau, and amyloid  $\beta$  up to 90 days after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 34, 66-73.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458-462.
- Botezelli, J. D., Coope, A., Ghezzi, A.C., Cambri, L.T., Moura, L. P., Scariot, P. P., Gaspar, R.S., Mekary, R. A., Ropelle, E. R., Pauli, J. R., 2016. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Scientific reports* 6, 31106.
- Brickson, S., Ji, L. L., Schell, K., Olabisi, R., St. Pierre Schneider, B., Best, T., 2003. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. *Journal of applied physiology* 95, 969-976.
- Brock-Utne, J. G., Gaffin, S. L., Wells, M. T., Gathiram, P., Sohar, E., James, M. F., Morrell, D. F., Norman, R. J., 1988. Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. *S Afr Med J* 73, 533-536.
- Bronte, V., Pittet, M. J., 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39, 806-818.

Budde, H., Schwarz, R., Velasques, B., Ribeiro, P., Holzweg, M., Machado, S., Brazaitis, M., Staack, F., Wegner, M., 2016. The need for differentiating between exercise, physical activity, and training. *Autoimmun Rev* 15, 110-111.

Campbell, J. P., Riddell, N.E., Burns, V. E., Turner, M., van Zanten, J. J., Drayson, M. T., Bosch, J. A., 2009. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. *Brain Behav Immun* 23, 767-775.

Campbell, J. P., Turner, J.E., 2018. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. *Front Immunol* 9, 648.

Caplan, B., Bogner, J., Brenner, L., Kumar, R.G., Boles, J.A., Wagner, A.K., 2015. Chronic inflammation after severe traumatic brain injury: characterization and associations with outcome at 6 and 12 months postinjury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation* 30, 369-381.

Caplan, H. W., Prabhakara, K. S., Kumar, A., Toledano-Furman, N.E., Martin, C., Carrillo, L., Moreno, N. F., Bordt, A. S., Olson, S. D., Cox Jr, C. S., 2020. Human cord blood-derived regulatory T-cell therapy modulates the central and peripheral immune response after traumatic brain injury. *Stem cells translational medicine* 9, 903-916.

Caspersen, C. J., Powell, K. E., Christenson, G. M., 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100, 126-131.

Cerda, B., Perez, M., Perez-Santiago, J. D., Tornero-Aguilera, J. F., Gonzalez-Soltero, R., Larrosa, M., 2016. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Front Physiol* 7, 51.

Chaban, V., Clarke, G. J. B., Skandsen, T., Islam, R., Einarsen, C. E., Vik, A., Damas, J. K., Mollnes, T. E., Haberg, A. K., Pischke, S. E., 2020. Systemic Inflammation Persists the First Year after Mild Traumatic Brain Injury: Results from the Prospective Trondheim Mild Traumatic Brain Injury Study. *J Neurotrauma* 37, 2120-2130.

Chavan, S. S., Pavlov, V. A., Tracey, K. J., 2017. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 46, 927-942.

Chen, C. -W., Chen, C. -C., Jian, C. -Y., Lin, P. -H., Chou, J.-C., Teng, H.-S., Hu, S., Lieu, F.-K., Wang, P.S., Wang, S.-W., 2016. Attenuation of exercise effect on inflammatory responses via novel role of TLR4/PI3K/Akt signaling in rat splenocytes. *Journal of Applied Physiology* 121, 870-877.

Chen, H., Richard, M., Sandler, D. P., Umbach, D. M., Kamel, F., 2007. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of epidemiology* 166, 810-816.

Chen, X., Duan, X.-S., Xu, L.-J., Zhao, J.-J., She, Z.-F., Chen, W.-W., Zheng, Z.-J., Jiang, G.-D., 2014. Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. *Neuroscience* 266, 235-243.

- Clark, A., Mach, N., 2017a. The Crosstalk between the Gut Microbiota and Mitochondria during Exercise. *Front Physiol* 8, 319.
- Clark, A., Mach, N., 2017b. The crosstalk between the gut microbiota and mitochondria during exercise. *Frontiers in physiology* 8, 319.
- Collins-Praino, L. E., Corrigan, F., 2017. Does neuroinflammation drive the relationship between tau hyperphosphorylation and dementia development following traumatic brain injury? *Brain, behavior, and immunity* 60, 369-382.
- Corps, K.N., Roth, T. L., McGavern, D. B., 2015. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA neurology* 72, 355-362.
- Corrigan, F., Mander, K.A., Leonard, A.V., Vink, R., 2016. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *Journal of neuroinflammation* 13, 1-12.
- Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., Coimbra, R., 2012. Targeting alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am J Pathol* 181, 478-486.
- da Luz Scheffer, D., Latini, A., 2020. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 165823.
- da Silva Fiorin, F., de Oliveira Ferreira, A.P., Ribeiro, L.R., Silva, L.F., de Castro, M.R., da Silva, L.R., da Silveira Jr, M.E., Zemolin, A.P., Dobrachinski, F., Marchesan de Oliveira, S., 2016. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: a behavioral and neurochemical approach. *Journal of neurotrauma* 33, 1317-1330.
- Daglas, M., Draxler, D.F., Ho, H., McCutcheon, F., Galle, A., Au, A.E., Larsson, P., Gregory, J., Alderuccio, F., Sashindranath, M., 2019. Activated CD8+ T cells cause long-term neurological impairment after traumatic brain injury in mice. *Cell reports* 29, 1178-1191. e1176.
- Dalton, A., Mermier, C., Zuhl, M., 2019a. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. *Gut Microbes* 10, 555-568.
- Dalton, A., Mermier, C., Zuhl, M., 2019b. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. *Gut Microbes* 10, 555-568.
- Das, M., Leonardo, C. C., Rangooni, S., Pennypacker, K.R., Mohapatra, S., Mohapatra, S.S., 2011. Lateral fluid percussion injury of the brain induces CCL20 inflammatory chemokine expression in rats. *J Neuroinflammation* 8, 148.

de Castro, M. R. T., de Oliveira Ferreira, A.P., Busanello, G.L., da Silva, L.R.H., da Silveira Junior, M.E.P., da Silva Fiorin, F., Arrifano, G., Crespo-López, M.E., Barcelos, R.P., Cuevas, M.J., 2017. Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats. *The Journal of physiology* 595, 6023-6044.

de Porto, A. P., Lammers, A.J., Bennink, R.J., ten Berge, I.J., Speelman, P., Hoekstra, J.B., 2010. Assessment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 1465-1473.

Denay, K. L., Breslow, R. G., Turner, M. N., Nieman, D. C., Roberts, W. O., Best, T. M., 2020. ACSM call to action statement: COVID-19 considerations for sports and physical activity. *Current sports medicine reports* 19, 326-328.

Di Battista, A. P., Rhind, S. G., Hutchison, M. G., Hassan, S., Shiu, M. Y., Inaba, K., Topolovec-Vranic, J., Neto, A.C., Rizoli, S.B., Baker, A.J., 2016. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury. *J Neuroinflammation* 13, 40.

Dinet, V., Petry, K. G., Badaut, J., 2019. Brain-immune interactions and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Frontiers in neuroscience* 13, 1178.

Edwards, P., Arango, M., Balica, L., Cottingham, R., El-Sayed, H., Farrell, B., Fernandes, J., Gogichaisvili, T., Golden, N., Hartzenberg, B., 2005. CRASH trial collaborators. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet* 365, 1957-1959.

Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., Ericsson, A., 1998. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 18, 9471-9479.

Erny, D., Prinz, M., 2017. Gut microbes augment neurodegeneration. *Nature* 544, 304-305.

Ertürk, A., Mentz, S., Stout, E.E., Hedeus, M., Dominguez, S.L., Neumaier, L., Krammer, F., Llovera, G., Srinivasan, K., Hansen, D.V., 2016. Interfering with the chronic immune response rescues chronic degeneration after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience* 36, 9962-9975.

Fenn, A. M., Gensel, J.C., Huang, Y., Popovich, P.G., Lifshitz, J., Godbout, J.P., 2014. Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: a role for primed microglia. *Biol Psychiatry* 76, 575-584.

Fernando Freire Royes, L., Cassol, G., 2016. The effects of Creatine supplementation and physical exercise on traumatic brain injury. *Mini reviews in medicinal chemistry* 16, 29-39.

Fischer, C.P., 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12, 6-33.

Garcia, J. M., Stillings, S. A., Leclerc, J.L., Phillips, H., Edwards, N.J., Robicsek, S.A., Hoh, B. L., Blackburn, S., Doré, S., 2017. Role of interleukin-10 in acute brain injuries. *Frontiers in neurology* 8, 244.

- Gavrilović, L., Stojiljković, V., Kasapović, J., Pejić, S., Todorović, A., Pajović, S.B., Dronjak, S., 2012. Forced exercise changes catecholamine synthesis in the spleen of adult rats. *Journal of neuroimmunology* 251, 1-5.
- Gentile, L. F., Cuenca, A. G., Efron, P. A., Ang, D., McKinley, B.A., Moldawer, L.L., Moore, F.A., 2012. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *The journal of trauma and acute care surgery* 72, 1491.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar–Ondiveeran, H., Verdu, E.F., Collins, S.M., 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 131, 1122-1130.
- Gielen, S., Adams, V., Linke, A., Erbs, S., Mobius-Winkler, S., Schubert, A., Schuler, G., Hambrecht, R., 2005. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12, 393-400.
- Giunta, B., Obregon, D., Velisetty, R., Sanberg, P.R., Borlongan, C.V., Tan, J., 2012. The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention. *Journal of neuroinflammation* 9, 1-8.
- Gleeson, M., 2007. Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology* 103, 693-699.
- Goldman, S. M., Tanner, C. M., Oakes, D., Bhudhikanok, G.S., Gupta, A., Langston, J.W., 2006. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. *Annals of neurology* 60, 65-72.
- Graff, R. M., Kunz, H. E., Agha, N. H., Baker, F.L., Laughlin, M., Bigley, A. B., Markofski, M.M., LaVoy, E. C., Katsanis, E., Bond, R.A., Bollard, C.M., Simpson, R.J., 2018. beta2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8+ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. *Brain Behav Immun* 74, 143-153.
- Green, D. R., Galluzzi, L., Kroemer, G., 2011. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109-1112.
- Gregory, T., Smith, M., 2012. Cardiovascular complications of brain injury. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 12, 67-71.
- Griesbach, G. S., 2011. Exercise after traumatic brain injury: Is it a double-edged sword? *PM&R* 3, S64-S72.
- Gubert, C., Kong, G., Renoir, T., Hannan, A.J., 2020. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease* 134, 104621.
- Haider, M. N., Bezherano, I., Wertheimer, A., Siddiqui, A.H., Horn, E.C., Willer, B.S., Leddy, J.J., 2021. Exercise for sport-related concussion and persistent postconcussive symptoms. *Sports health* 13, 154-160.

- Hall, S., Kumaria, A., Belli, A., 2014. The role of vagus nerve overactivity in the increased incidence of pneumonia following traumatic brain injury. *British journal of neurosurgery* 28, 181-186.
- Hang, C. H., Shi, J.X., Li, J.S., Wu, W., Yin, H. X., 2003. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol* 9, 2776-2781.
- Hanscom, M., Loane, D.J., Aubretch, T., Leser, J., Molesworth, K., Hedgekar, N., Ritzel, R.M., Abulwerdi, G., Shea-Donohue, T., Faden, A.I., 2021a. Acute colitis during chronic experimental traumatic brain injury in mice induces dysautonomia and persistent extraintestinal, systemic, and CNS inflammation with exacerbated neurological deficits. *J Neuroinflammation* 18, 24.
- Hanscom, M., Loane, D.J., Shea-Donohue, T., 2021b. Brain-gut axis dysfunction in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Journal of Clinical Investigation* 131, e143777.
- Hawley, J.A., Hargreaves, M., Joyner, M.J., Zierath, J.R., 2014. Integrative biology of exercise. *Cell* 159, 738-749.
- Hensler, T., Sauerland, S., Bouillon, B., Raum, M., Rixen, D., Helling, H.-J., Andermahr, J., Neugebauer, E.A., 2002. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 52, 962-970.
- Hensler, T., Sauerland, S., Riess, P., Hess, S., Helling, H., Andermahr, J., Bouillon, B., Neugebauer, E., 2000. The effect of additional brain injury on systemic interleukin (IL)-10 and IL-13 levels in trauma patients. *Inflammation Research* 49, 524-528.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casadó, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., 2002. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18091-18097.
- Holsinger, T., Steffens, D.C., Phillips, C., Helms, M.J., Havlik, R.J., Breitner, J.C., Guralnik, J.M., Plassman, B.L., 2002. Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. *Archives of general psychiatry* 59, 17-22.
- Houlden, A., Goldrick, M., Brough, D., Vizi, E.S., Lénárt, N., Martinecz, B., Roberts, I., Denes, A., 2016. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. *Brain, behavior, and immunity* 57, 10-20.
- Huang, X., Reynolds, A.D., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., 2009. CD 4+ T cells in the pathobiology of neurodegenerative disorders. *Journal of neuroimmunology* 211, 3-15.
- Huber-Lang, M., Lambris, J.D., Ward, P.A., 2018. Innate immune responses to trauma. *Nature immunology* 19, 327-341.



- Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 203, 1623-1628.
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Torras-Garcia, M., Borlongan, C.V., Portell-Cortés, I., 2015. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma* 32, 739-751.
- Jia, K., Tong, X., Liang, F., 2018. Effects of sequential nutritional support on nutritional status and expression of regulatory T lymphocyte in patients with early severe traumatic brain injury. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14, 1561-1567.
- Joo, J., Williamson, S.A., Vazquez, A.I., Fernandez, J.R., Bray, M.S., 2019. The influence of 15-week exercise training on dietary patterns among young adults. *International Journal of Obesity* 43, 1681-1690.
- Juengst, S.B., Kumar, R.G., Failla, M.D., Goyal, A., Wagner, A.K., 2015. Acute inflammatory biomarker profiles predict depression risk following moderate to severe traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation* 30, 207-218.
- Kakanis, M., Peake, J., Hooper, S., Gray, B., Marshall-Gradisnik, S., 2010. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Journal of Science and Medicine in Sport* 13, e85-e86.
- Kang, S.S., Jeraldo, P.R., Kurti, A., Miller, M.E.B., Cook, M.D., Whitlock, K., Goldenfeld, N., Woods, J.A., White, B.A., Chia, N., 2014. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Molecular neurodegeneration* 9, 1-12.
- Kappel, M., Tvede, N., Galbo, H., Haahr, P.M., Kjaer, M., Linstow, M., Klarlund, K., Pedersen, B.K., 1991. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J Appl Physiol* (1985) 70, 2530-2534.
- Karlin, A.M., 2011. Concussion in the pediatric and adolescent population: "different population, different concerns". *PM&R* 3, S369-S379.
- Kawahara, E., Ikeda, S., Miyahara, Y., Kohno, S., 2003. Role of autonomic nervous dysfunction in electrocardio-graphic abnormalities and cardiac injury in patients with acute subarachnoid hemorrhage. *Circulation journal* 67, 753-756.
- Kharrazian, D., 2015. Traumatic Brain Injury and the Effect on the Brain-Gut Axis. *Altern Ther Health Med* 21 Suppl 3, 28-32.
- Khera, T.K., Copland, D.A., Boldison, J., Lait, P.J., Szymkowski, D.E., Dick, A.D., Nicholson, L.B., 2012. Tumour necrosis factor-mediated macrophage activation in the target organ is critical for clinical manifestation of uveitis. *Clin Exp Immunol* 168, 165-177.

Kim, J.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* 8, 191-197.

Kimura, H., Imura, Y.K., Tomiyasu, H., Mihara, T., Kaji, N., Ohno, K., Unno, T., Tanahashi, Y., Jan, T.R., Tsubone, H., Ozaki, H., Hori, M., 2019a. Neural anti-inflammatory action mediated by two types of acetylcholine receptors in the small intestine. *Sci Rep* 9, 5887.

Kimura, K., Inaba, Y., Watanabe, H., Matsukawa, T., Matsumoto, M., Inoue, H., 2019b. Nicotinic alpha-7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Diabetes Investig* 10, 659-666.

Klein, R. S., Garber, C., Howard, N., 2017. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. *Nat Immunol* 18, 132-141.

Kottke, M. A., Walters, T. J., 2016. Where's the leak in vascular barriers? A review. *Shock* 46, 20-36.

Kramer, T. J., Hack, N., Bruhl, T. J., Menzel, L., Hummel, R., Griemert, E.V., Klein, M., Thal, S.C., Bopp, T., Schafer, M.K.E., 2019. Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon-gamma gene expression in acute experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 16, 163.

Krüger, K., Lechtermann, A., Fobker, M., Völker, K., Mooren, F., 2008. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. *Brain, behavior, and immunity* 22, 324-338.

Kruger, K., Lechtermann, A., Fobker, M., Volker, K., Mooren, F.C., 2008. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. *Brain Behav Immun* 22, 324-338.

Kruger, K., Mooren, F.C., 2007. T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev* 13, 37-54.

Kumar, A., Alvarez-Croda, D.-M., Stoica, B.A., Faden, A.I., Loane, D.J., 2016. Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 33, 1732-1750.

Kumar, R. G., Di Santo, D., Awan, N., Vaughan, L.E., Levochkina, M.S., Weppner, J.L., Wright, D.W., Berga, S.L., Conley, Y.P., Brooks, M.M., 2020. Temporal Acute Serum Estradiol and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Associations and Risk of Death after Severe Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 37, 2198-2210.

Kwak, Y.-S., Um, S.-Y., Kim, D.-E., Hwang, H.-J., 2005. The effect of different type of exercise on SOD, neutrophils and T lymphocytes. *Immune Network* 5, 232-236.

Lee, K., Rincon, F., 2012. Pulmonary complications in patients with severe brain injury. *Critical care research and practice* 2012.

Lee, S.W., Gajavelli, S., Spurlock, M.S., Andreoni, C., de Rivero Vaccari, J. P., Bullock, M.R., Keane, R.W., Dietrich, W.D., 2018. Microglial inflammasome activation in penetrating ballistic-like brain injury. *Journal of Neurotrauma* 35, 1681-1693.

- Lewis, S. M., Williams, A., Eisenbarth, S.C., 2019. Structure and function of the immune system in the spleen. *Science immunology* 4.
- Li, M., Lin, Y.P., Chen, J.L., Li, H., Jiang, R.C., Zhang, J.N., 2015. Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury. *Chin Med J (Engl)* 128, 1072-1078.
- Li, Z., Liu, S., Wang, L., Smith, L., 2020. Mind–body exercise for anxiety and depression in copd patients: A systematic review and meta-analysis. *International journal of environmental research and public health* 17, 22.
- Liao, P., He, Q., Zhou, X., Ma, K., Wen, J., Chen, H., Li, Q., Qin, D., Wang, H., 2020. Repetitive bouts of exhaustive exercise induces a systemic inflammatory response and multi-organ damage in rats. *Frontiers in physiology* 11, 685.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., Veltkamp, R., 2009. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine* 15, 192-199.
- Lima, F. D., Oliveira, M. S., Furian, A. F., Souza, M. A., Rambo, L.M., Ribeiro, L. R., Silva, L. F. A., Retamoso, L. T., Hoffmann, M.S., Magni, D.V., 2009. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain research* 1279, 147-155.
- Lindsay, A., Lewis, J., Scarrott, C., Draper, N., Gieseg, S.P., 2015. Changes in acute biochemical markers of inflammatory and structural stress in rugby union. *J Sports Sci* 33, 882-891.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., Issazadeh-Navikas, S., 2006. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nature medicine* 12, 518-525.
- Liu, Y., Wang, Y., Ni, Y., Cheung, C.K., Lam, K.S., Wang, Y., Xia, Z., Ye, D., Guo, J., Tse, M. A., 2020. Gut microbiome fermentation determines the efficacy of exercise for diabetes prevention. *Cell Metabolism* 31, 77-91. e75.
- Loane, D.J., Kumar, A., 2016. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology* 275, 316-327.
- Ma, E. L., Smith, A. D., Desai, N., Cheung, L., Hanscom, M., Stoica, B.A., Loane, D.J., Shea-Donohue, T., Faden, A.I., 2017. Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun* 66, 56-69.
- Maas, A. I., Menon, D. K., Adelson, P. D., Andelic, N., Bell, M. J., Belli, A., Bragge, P., Brazinova, A., Büki, A., Chesnut, R. M., 2017. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology* 16, 987-1048.
- Mackinnon, L. T., Hooper, S. L., Jones, S., Gordon, R. D., Bachmann, A. W., 1997. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 29, 1637-1645.

Malin, S. K., Hinnerichs, K.R., Echtenkamp, B. G., Evetovich, T. K., Engebretsen, B. J., 2013. Effect of adiposity on insulin action after acute and chronic resistance exercise in non-diabetic women. *Eur J Appl Physiol* 113, 2933-2941.

Marques-Aleixo, I., Oliveira, P.J., Moreira, P.I., Magalhaes, J., Ascensao, A., 2012. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog Neurobiol* 99, 149-162.

Martelli, D., McKinley, M.J., McAllen, R.M., 2014. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci* 182, 65-69.

Martin-Cordero, L., Garcia, J., Giraldo, E., De la Fuente, M., Manso, R., Ortega, E., 2009. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *European journal of applied physiology* 107, 535-543.

Matteoli, G., Gomez-Pinilla, P.J., Nemethova, A., Di Giovangiulio, M., Cailotto, C., van Bree, S.H., Michel, K., Tracey, K.J., Schemann, M., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Boeckxstaens, G.E., 2014. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut* 63, 938-948.

McGee, S. L., Hargreaves, M., 2020. Exercise adaptations: molecular mechanisms and potential targets for therapeutic benefit. *Nat Rev Endocrinol* 16, 495-505.

McHugh, G. S., Engel, D. C., Butcher, I., Steyerberg, E.W., Lu, J., Mushkudiani, N., Hernandez, A.V., Marmarou, A., Maas, A.I., Murray, G.D., 2007. Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 24, 287-293.

McKee, C. A., Lukens, J. R., 2016. Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. *Frontiers in Immunology* 7, 556.

Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.  
Micheli, L., Ceccarelli, M., D'Andrea, G., Tirone, F., 2018. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull* 143, 181-193.

Moalem, G., Tracey, D. J., 2006. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* 51, 240-264.

Morris, N. A., Cool, J., Merkler, A.E., Kamel, H., 2017. Subarachnoid Hemorrhage and Long-Term Stroke Risk After Traumatic Brain Injury. *Neurohospitalist* 7, 122-126.

Mota, B. C., Pereira, L., Souza, M. A., Silva, L. F. A., Magni, D. V., Ferreira, A. P. O., Oliveira, M. S., Furian, A. F., Mazzardo-Martins, L., Da Silva, M. D., 2012. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotoxicity research* 21, 175-184.

- Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M., Suzuki, K., 2014. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2583-2598.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., O'Shea, J.J., 2012. Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology* 24, 297-302.
- Noble, B. T., Brennan, F. H., Popovich, P. G., 2018. The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 321, 1-11.
- Ouellet, M. -C., Sirois, M. -J., Beaulieu-Bonneau, S., Gagné, M. -È., Morin, J., Perry, J., Daoust, R., Wilding, L., Provencher, V., Camden, S., 2016. Correlates of cognitive functioning in independent elderly patients discharged home from the emergency department after a minor injury. *International psychogeriatrics* 28, 1313.
- Peake, J.M., Neubauer, O., Walsh, N.P., Simpson, R.J., 2017. Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol* (1985) 122, 1077-1087.
- Pedersen, B. K., Febbraio, M. A., 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology* 8, 457-465.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., 2002. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6—shared mechanisms? *Medicine & Science in Sports & Exercise* 34, 2004-2012.
- Perry, S. A., Coetzer, R., Saville, C. W., 2020. The effectiveness of physical exercise as an intervention to reduce depressive symptoms following traumatic brain injury: A meta-analysis and systematic review. *Neuropsychological rehabilitation* 30, 564-578.
- Petersen, A. M., Pedersen, B. K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98, 1154-1162.
- Pfister, T., Pfister, K., Hagel, B., Ghali, W.A., Ronksley, P.E., 2016. The incidence of concussion in youth sports: a systematic review and meta-analysis. *British journal of sports medicine* 50, 292-297.
- Piao, C. S., Stoica, B. A., Wu, J., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Cabatbat, R., Loane, D.J., Faden, A.I., 2013. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 54, 252-263.
- Pillon Barcelos, R., Freire Royes, L.F., Gonzalez-Gallego, J., Bresciani, G., 2017. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free radical research* 51, 222-236.
- Plesnila, N., 2016. The immune system in traumatic brain injury. *Current opinion in pharmacology* 26, 110-117.
- Powell, N., Walker, M. M., Talley, N. J., 2017a. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 143-159.

Powell, N., Walker, M. M., Talley, N. J., 2017b. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut–brain communications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 14, 143-159.

Proschinger, S., Freese, J., 2019. Neuroimmunological and neuroenergetic aspects in exercise-induced fatigue. *Exercise immunology review* 25.

Radak, Z., Suzuki, K., Higuchi, M., Balogh, L., Boldogh, I., Koltai, E., 2016. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 98, 187-196.

Radak, Z., Torma, F., Berkes, I., Goto, S., Mimura, T., Posa, A., Balogh, L., Boldogh, I., Suzuki, K., Higuchi, M., Koltai, E., 2019. Exercise effects on physiological function during aging. *Free Radic Biol Med* 132, 33-41.

Rasouli, J., Lekhraj, R., Ozbalik, M., Lalezari, P., Casper, D., 2011. Brain-spleen inflammatory coupling: a literature review. *The Einstein journal of biology and medicine: EJBM* 27, 74.

Raveney, B.J., Copland, D.A., Calder, C.J., Dick, A.D., Nicholson, L.B., 2010. TNFR1 signalling is a critical checkpoint for developing macrophages that control of T-cell proliferation. *Immunology* 131, 340-349.

Ren, D., Zheng, P., Feng, J., Gong, Y., Wang, Y., Duan, J., Zhao, L., Deng, J., Chen, H., Zou, S., 2020. Overexpression of Astrocytes-Specific GJA1-20k Enhances the Viability and Recovery of the Neurons in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *ACS chemical neuroscience* 11, 1643-1650.

Rhee, S. H., Pothoulakis, C., Mayer, E. A., 2009. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 6, 306.

Roberts, I., Yates, D., Sandercock, P., Farrell, B., Wasserberg, J., Lomas, G., Cottingham, R., Svoboda, P., Brayley, N., Mazairac, G., 2004. CRASH trial collaborators. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 364, 1321-1328.

Roca, E., Cantó, E., Nescolarde, L., Perea, L., Bayes-Genis, A., Sibila, O., Vidal, S., 2019. Effects of a polysaccharide-based multi-ingredient supplement on salivary immunity in non-elite marathon runners. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 16, 1-8.

Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y.T., Huston, J.M., Chavan, S., Tracey, K.J., 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11008-11013.

Royes, L. F. F., 2020. Cross-talk between gut and brain elicited by physical exercise. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 165877.

Royes, L. F. F., Gomez-Pinilla, F., 2019. Making sense of gut feelings in the traumatic brain injury pathogenesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 102, 345-361.

Russo, M. V., McGavern, D. B., 2017. Distinct Myeloid Cell Subsets Promote Angiogenesis and Damaged Tissue Clearance Following Mild Traumatic Brain Injury. *Am Assoc Immunol*.

- Scheffer, D. D. L., Ghisoni, K., Aguiar, A. S., Jr., Latini, A., 2019. Moderate running exercise prevents excessive immune system activation. *Physiol Behav* 204, 248-255.
- Scheffer, D. D. L., Latini, A., 2020. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866, 165823.
- Scheiman, J., Lubner, J. M., Chavkin, T. A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L. D., Wibowo, M.C., Wurth, R. C., Punthambaker, S., Tierney, B.T., Yang, Z., Hattab, M.W., Avila-Pacheco, J., Clish, C. B., Lessard, S., Church, G.M., Kostic, A.D., 2019. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 25, 1104-1109.
- Schiweck, J., Murk, K., Ledderose, J., Münster-Wandowski, A., Vida, I., Johanna, B., Eickholt, J., 2020. Drebrin mediates scar formation and astrocyte reactivity during brain injury by inducing RAB8 tubular endosomes. *bioRxiv*.
- Schwulst, S.J., Trahanas, D.M., Saber, R., Perlman, H., 2013. Traumatic brain injury-induced alterations in peripheral immunity. *The journal of trauma and acute care surgery* 75, 780.
- Sen, T., Saha, P., Gupta, R., Foley, L.M., Jiang, T., Abakumova, O.S., Hitchens, T.K., Sen, N., 2020. Aberrant ER Stress Induced Neuronal-IFNbeta Elicits White Matter Injury Due to Microglial Activation and T-Cell Infiltration after TBI. *J Neurosci* 40, 424-446.
- Serhan, C. N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* 6, 1191-1197.
- Sharkey, J., Ressel, L., Brilliant, N., Scarfe, L., Wilm, B., Park, B.K., Murray, P., 2019. A noninvasive imaging toolbox indicates limited therapeutic potential of conditionally activated macrophages in a mouse model of multiple organ dysfunction. *Stem cells international* 2019.
- Shephard, R. J., 2015. Exercise proteinuria and hematuria: current knowledge and future directions. *The Journal of sports medicine and physical fitness* 56, 1060-1076.
- Shimojo, G., Joseph, B., Shah, R., Consolim-Colombo, F.M., De Angelis, K., Ulloa, L., 2019. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. *Brain, behavior, and immunity* 75, 181-191.
- Silva, L. F. A., Hoffmann, M.S., Gerbatin, R.d.R., Fiorin, F.d.S., Dobrachinski, F., Mota, B.C., Wouters, A. T. B., Pavarini, S.P., Soares, F.A.A., Figuera, M.R., 2013. Treadmill exercise protects against pentylenetetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 30, 1278-1287.
- Simpson, R. J., Kunz, H., Agha, N., Graff, R., 2015. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135, 355-380.
- Stewart, L. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., McFarlin, B. K., Timmerman, K. L., Coen, P.M., Felker, J., Talbert, E., 2005a. Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain, behavior, and immunity* 19, 389-397.

Stewart, L. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., McFarlin, B. K., Timmerman, K. L., Coen, P. M., Felker, J., Talbert, E., 2005b. Influence of exercise training and age on CD14<sup>+</sup> cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain Behav Immun* 19, 389-397.

Straub, R. H., 2014. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis research & therapy* 16, 1-15.

Sun, B., Hu, C., Fang, H., Zhu, L., Gao, N., Zhu, J., 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal smooth muscle contraction through PKC/MLCK/MLC signaling pathway in TBI mouse model. *PloS one* 10, e0128214.

Sundman, M. H., Chen, N. -K., Subbian, V., Chou, Y.-h., 2017. The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease. *Brain, behavior, and immunity* 66, 31-44.

Svensson, M., Lexell, J., Deierborg, T., 2015. Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings. *Neurorehabilitation and neural repair* 29, 577-589.

Tapp, Z. M., Godbout, J. P., Kokiko-Cochran, O. N., 2019. A tilted axis: maladaptive inflammation and HPA axis dysfunction contribute to consequences of TBI. *Frontiers in neurology* 10, 345.

The, F., Cailotto, C., van der Vliet, J., de Jonge, W. J., Bennink, R. J., Buijs, R. M., Boeckxstaens, G. E., 2011. Central activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces surgical inflammation in experimental post-operative ileus. *Br J Pharmacol* 163, 1007-1016.

Tiesi, G., Reino, D., Mason, L., Palange, D., Tomaiolo, J. N., Deitch, E. A., 2013. Early trauma-hemorrhage-induced splenic and thymic apoptosis is gut-mediated and toll-like receptor 4-dependent. *Shock* 39, 507-513.

Tracey, K. J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853-859.

Tsuchida, Y., Hatao, F., Fujisawa, M., Murata, T., Kaminishi, M., Seto, Y., Hori, M., Ozaki, H., 2011. Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via  $\alpha 7$ nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Gut* 60, 638-647.

Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J.J., Rey, F. E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine* 1, 6ra14-16ra14.

Uhlich, R., Pierce, V., Kerby, J., Bosarge, P., Hu, P., 2020. Splenectomy does not affect the development of pneumonia following severe traumatic brain injury. *Brain, Behavior, & Immunity-Health* 1, 100007.



- Ulges, A., Schmitt, E., Becker, C., Bopp, T., 2016. Context-and tissue-specific regulation of immunity and tolerance by regulatory T cells, *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 1-46.
- Urban, R. J., Pyles, R. B., Stewart, C. J., Ajami, N., Randolph, K. M., Durham, W. J., Danesi, C. P., Dillon, E. L., Summons, J. R., Singh, C. K., Morrison, M., Kreber, L. A., Masel, B., Miller, A. L., Wright, T. J., Sheffield-Moore, M., 2020. Altered Fecal Microbiome Years after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 37, 1037-1051.
- van Wijck, K., Lenaerts, K., Grootjans, J., Wijnands, K. A., Poeze, M., van Loon, L.J., Dejong, C. H., Buurman, W. A., 2012. Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G155-168.
- Vanderbeken, I., Kerckhofs, E., 2017. A systematic review of the effect of physical exercise on cognition in stroke and traumatic brain injury patients. *NeuroRehabilitation* 40, 33-48.
- Villapol, S., 2016. Consequences of hepatic damage after traumatic brain injury: current outlook and potential therapeutic targets. *Neural regeneration research* 11, 226.
- Wagner, A., Kumar, R., 2019. TBI rehabiliomics research: conceptualizing a humoral triad for designing effective rehabilitation interventions. *Neuropharmacology* 145, 133-144.
- Walker, P. A., Shah, S. K., Jimenez, F., Gerber, M. H., Xue, H., Cutrone, R., Hamilton, J. A., Mays, R. W., Deans, R., Pati, S., 2010. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes. *Experimental neurology* 225, 341-352.
- Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Gleeson, M., Woods, J.A., Bishop, N., Fleshner, M., Green, C., Pedersen, B.K., Hoffman-Goete, L., 2011. Position statement part one: immune function and exercise.
- Walsh, N. P., Oliver, S. J., 2016. Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. *Immunology and cell biology* 94, 132-139.
- Wang, C.-f., Zhao, C.-c., Liu, W.-l., Huang, X.-j., Deng, Y.-f., Jiang, J.-y., Li, W.-p., 2020. Depletion of microglia attenuates dendritic spine loss and neuronal apoptosis in the acute stage of moderate traumatic brain injury in mice. *Journal of neurotrauma* 37, 43-54.
- Wazea, S. A., Wadie, W., Bahgat, A. K., El-Abhar, H.S., 2018. Galantamine anti-colitic effect: Role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in modulating Jak/STAT3, NF-kappaB/HMGB1/RAGE and p-AKT/Bcl-2 pathways. *Sci Rep* 8, 5110.
- Wei, L., Wen, Y.-T., Thompson, H.J., Liu, C.-Y., Su, Y.-K., Chen, P.-Y., Chen, C.-Y., Chuang, Y.-H., Lin, Y.-J., Chen, C.-T., 2020. Sleep disturbances following traumatic brain injury in older adults: a comparison study. *The Journal of head trauma rehabilitation* 35, 288-295.
- Wilson, L., Stewart, W., Dams-O'Connor, K., Diaz-Arrastia, R., Horton, L., Menon, D.K., Polinder, S., 2017. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *The Lancet Neurology* 16, 813-825.

Yoo, B. B., Mazmanian, S. K., 2017. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46, 910-926.

Zhang, F., Zuo, T., Yeoh, Y.K., Cheng, F.W., Liu, Q., Tang, W., Cheung, K. C., Yang, K., Cheung, C. P., Mo, C. C., 2021. Longitudinal dynamics of gut bacteriome, mycobiome and virome after fecal microbiota transplantation in graft-versus-host disease. *Nature Communications* 12, 1-11.

Zhang, X., Jiang, X., 2015. Effects of enteral nutrition on the barrier function of the intestinal mucosa and dopamine receptor expression in rats with traumatic brain injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 39, 114-123.

Zheng, G., Zhou, W., Xia, R., Tao, J., Chen, L., 2016. Aerobic exercises for cognition rehabilitation following stroke: a systematic review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 25, 2780-2789.

Figure 1 - The proposed mechanism that the spleen may cause a beneficial or harmful signaling pathway after TBI. 1) The hypothalamus receives inflammatory action after TBI that increases the production and release of norepinephrine through simpatic nervous system. 2) Adrenaline and nor epinephrine binding to the adrenergic receptors in splenic macrophages, causing the release of inflammatory cytokines and splenic hypoperfusion. 3) Intestinal permeability increases due to spleen signaling, leading to damage to the gut. 4)In the spleen, the harmful signaling to the brain may be mediated by the pro-inflammatory profile of splenic Treg cells through Th1 cells in white matter and lymphocytes CD8<sup>+</sup> in the BBB. 5) The beneficial signaling is mediated by the anti-inflammatory profile of the splenic Treg cells through Th2 cells in white matter and splenocytes CD4<sup>+</sup> cells in the BBB. Norepinephrine (Ne); Adrenaline (A); Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Interleukin  $\beta$ (IL-1 $\beta$ ); Blood-brain barrier (BBB); Interleukin 4 (IL-4); Interleukin 10 (IL-10); Dotted arrows: harmful signaling; Continuous arrows: beneficial signaling.

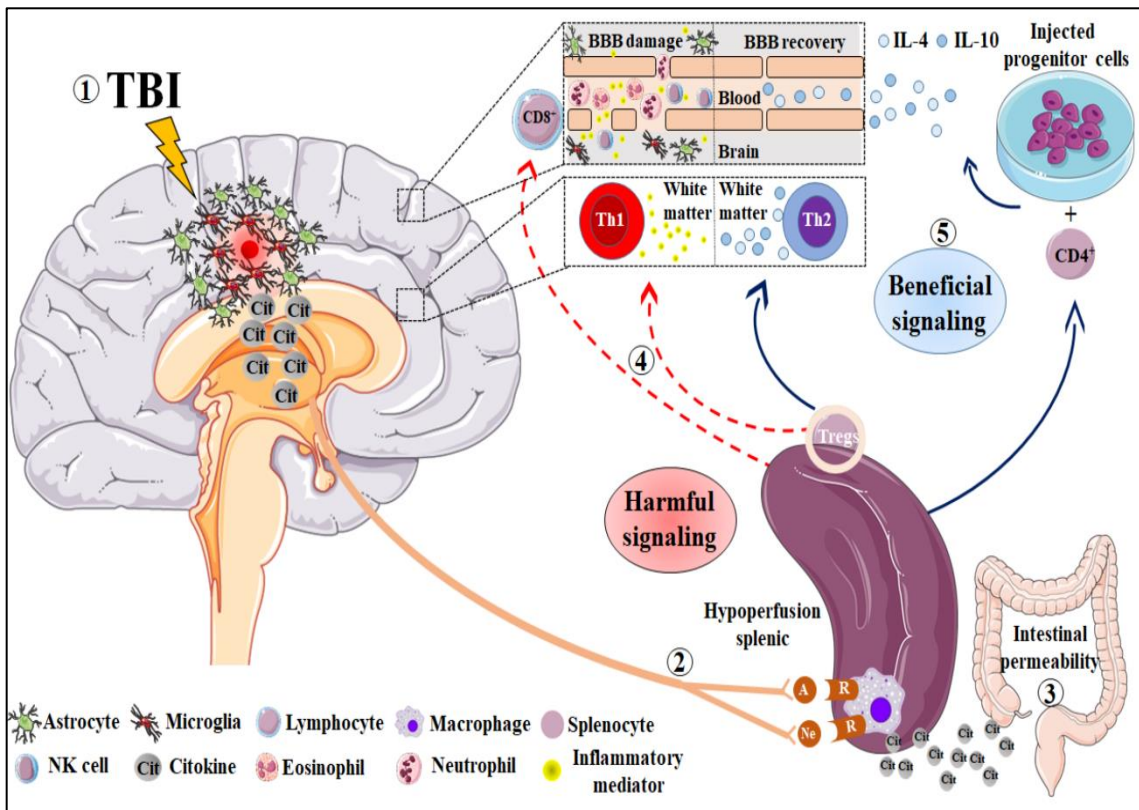


Figure 2 - Possible mechanisms of connection between the brain-gut-spleen after TBI. 1) TBI leads to a neuroinflammatory response in the brain, causing numerous consequences that can hyperactivate the HPA axis, (2) leading to higher cortisol blood levels and long-term impairment of gut motility function and dysbiosis. 3) Norepinephrine and Epinephrine release due to sympathetic tone prevalence may bind on  $\alpha$ -adrenergic receptors located in splenic macrophages, causing TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release, which leads to a systemic inflammatory response and the translocation of lymphocytes CD8<sup>+</sup> to the brain. The cytokines produced can reach the systemic circulation and act on the gut and brain (4, 5). The sympathetic signaling is also pointed as one of the major causes of intestinal dysfunctions after TBI, impairing the mucous production, causing alterations in microbial composition and the breakdown of the intestinal wall, allowing PAMPs and pro-inflammatory mediators to reach the brain and possibly facilitating the development of CNS disorders (3). As seen in ischemic models of brain injury, it is plausible to propose that  $\gamma\delta$  T cells derived from the gut can cross the BBB and cause damage to the CNS. 6) In this sense, it is also proposed that gut-derived lymph factors may cause apoptosis in splenic cells through TLR4. Blood-brain barrier (BBB); Hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA); Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ); Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs); Toll-like receptor 4 (TLR4); Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ).

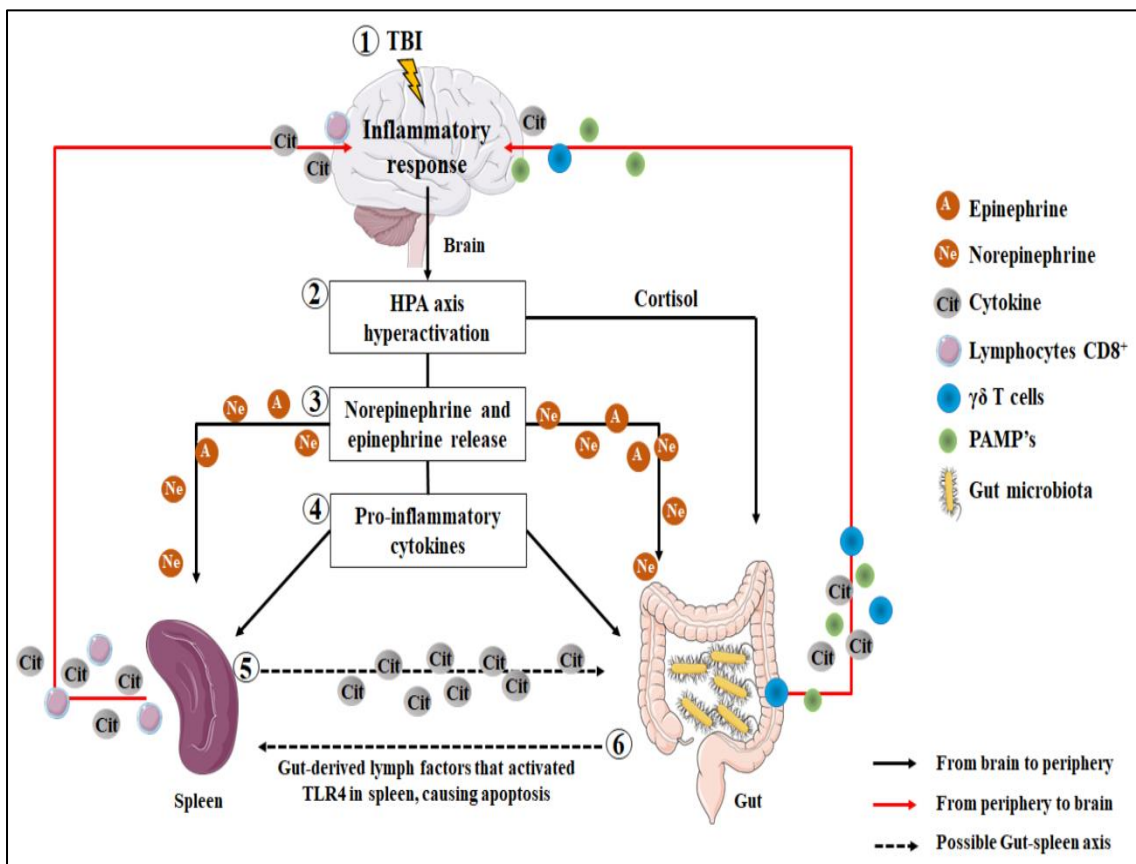


Figure 3 - General body effects of physical exercise. Acute/strenuous physical exercise induced stress response by the body, and the HPA axis hyper activation together with the gastrointestinal blood flow reduction are capable of affecting the intestinal barrier, allowing PAMPs to enter circulation. During and right after a strenuous session, a lymphocytosis was observed with the contribution of the spleen. About to 1-2 h after, a lymphopenia was found in the blood, which may be a period of immune suppression or mobilization of immune cells to organs that are more susceptible to infection. In addition, acute stress is fundamental for the development of chronic adaptations, including reduced TLR expression in immune cells and white adipose tissue (WAT), leading to a decreased pro-inflammatory state. Myokine production by the contracting muscle can also communicate with other organs, including the brain, leading to higher BDNF levels. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF); Hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA); Interleukin 6 (IL-6); Interleukin 15 (IL-15); Interleukin 18 (IL-18); Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs); Toll-like receptor 4 (TLR4); Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); White adipose tissue (WAT).

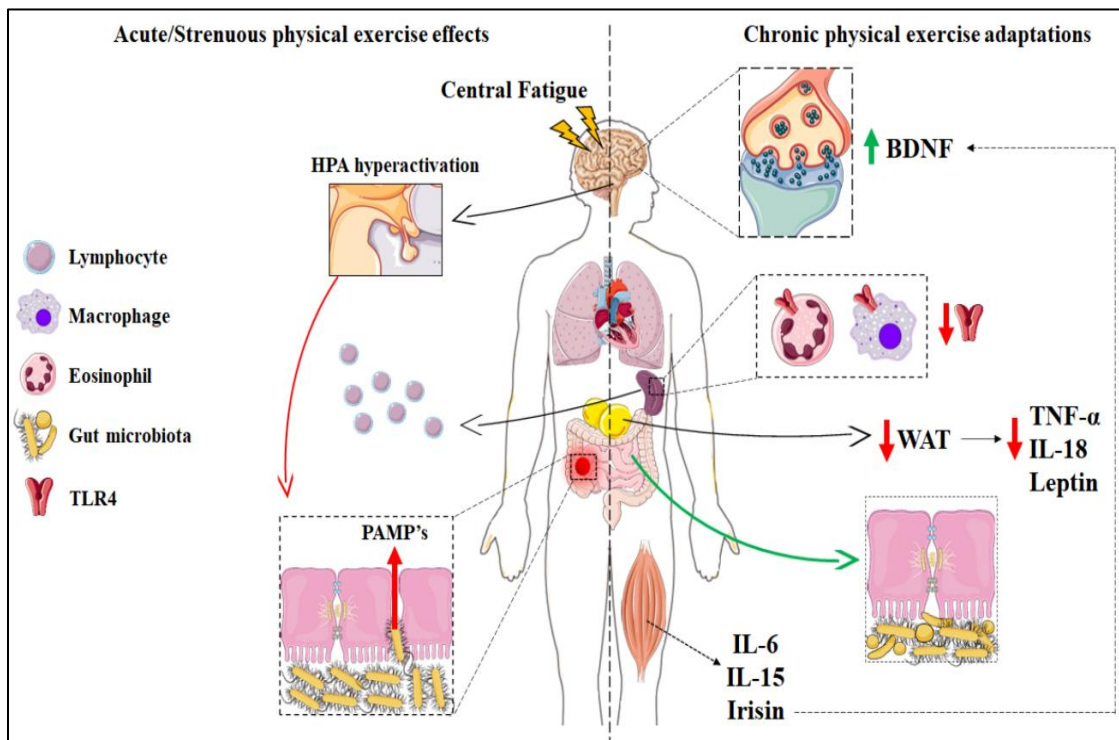


Figure 4 - The beneficial effects of physical exercise on TBI treatment: proposed mechanisms of action through the brain-spleen-gut axis. 1) Physical exercise as a non-pharmacological treatment for TBI can exert benefits by improving the vagal tonus. 2) Acetylcholine signaling in  $\alpha 7$  nAChR in macrophages of the spleen or gut produces an anti-inflammatory effect due to NF- $\kappa$ B inhibition and anti-oxidant action through Nrf2, which is an important transcription factor that limits TBI damage on the gut and seems to have a role in intestinal wall integrity. 3) The microbial diversification induced by exercise on gut microbiota can affect important rate-limiting enzymes involved in tryptophan metabolism: up regulating TPH1 and down regulating IDO, which favors serotonin production to exert beneficial effects on gut function. 4) The increased expression of PGC1 $\alpha$  in the intestine induced by physical exercise, besides promoting mitochondrial biogenesis (which reinforces intestinal wall integrity), can also induce the activity of the enzyme KAT. 5) The SCFA produced by the exercise modulated microbiota also serves as fuel for the mitochondria and exert anti-inflammatory action on the intestinal epithelium. Acetylcholine (Ach); Protein kinase B (AKT); 5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK); Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ); Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO); Janus Kinase 2 (JAK2); Kynurenine aminotransferase (KAT); Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B); Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co activator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ); Phosphoinositide 3-kinase (PI3K); Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1).

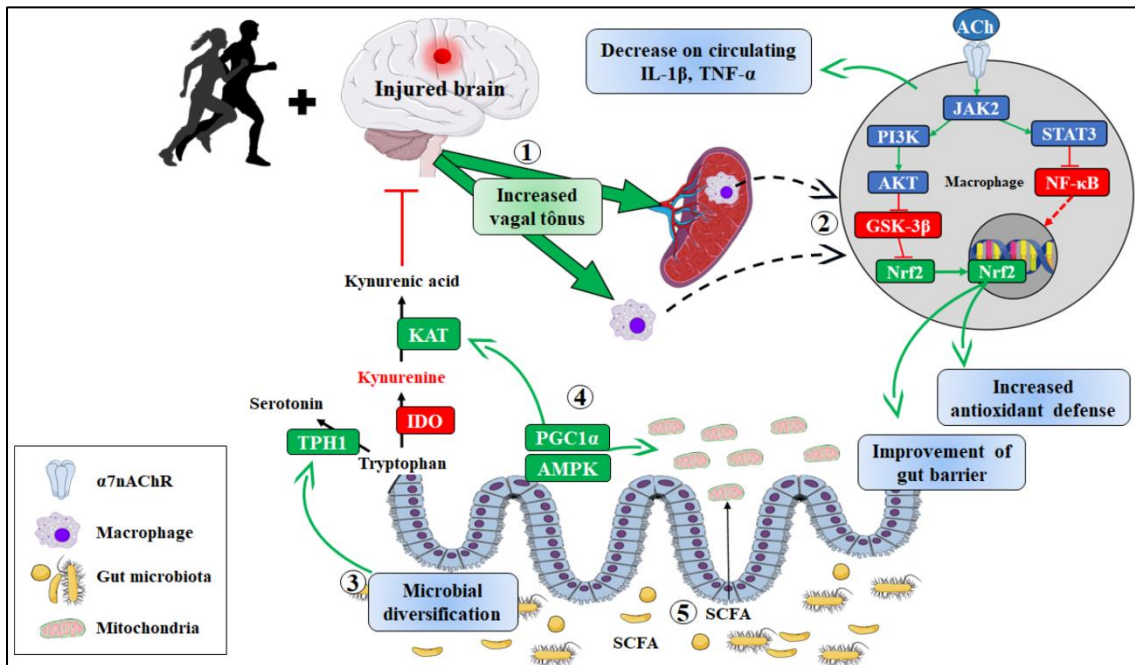


Table 1 – Summary of clinical studies and the main outcomes addressing the effects of TBI on systemic inflammation

<b>STUDY</b>	<b>SUB-JECTS</b>	<b>TBI SEVERITY</b>	<b>PURPOSE</b>	<b>MAIN OUTCOMES</b>
Kumar et al. (2020)	Adults patients	Severe	Evaluate feedback between acute TNF- $\alpha$ and estradiol and if there are prognostic indicators of mortality after TBI.	Systemic TNF- $\alpha$ and estradiol were indicative of systemic compromise and increased risk of death after severe TBI.
Chaban et al. (2020)	Patients (16-59 years old)	Mild	Verify if mTBI increases systemic cytokines and association with injury-related and demographic factors.	Plasma levels of the cytokines increased and remained at 12 months. There was no association in MRI findings with cytokines, whereas age was associated with higher cytokines levels.
Bogoslovsky et al. (2017)	Patients with varied TBI severity	TBI cases and complicated mild TBI	Evaluate GFAP, tau, and A $\beta$ 42 and their association with injury severity and clinical outcomes.	Increase markers for up to 90 days after TBI. Tau levels correlated with clinical-radiological variables of TBI severity, whereas A $\beta$ 42 correlated with clinical outcomes.
Battista et al. (2016)	Patients (aged 45 $\pm$ 20.3 years; 74.7% male)	Moderate and severe isolated blunt TBI	Evaluate the temporal profile of a panel of circulating cytokines and chemokines acutely after injury.	TBI altered levels of IL-10 and all chemokines. Differences between moderate and severe TBI in a number of markers. Elevated IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , and 8 of 9 chemokines were associated with poor outcomes at six months.
Caplan et al. (2015)	Adults patients	Severe	Measure chronic cytokines and associate with outcomes after 6 to 12 months.	Several cytokines were elevated over three months after TBI and IL-6 elevate pro-inflammatory burden.

Kumar et al. (2015)	Adults patients	Severe (isolate and politrauma)	Evaluate the temporal acute IL-6 trajectory (TRAJ) profile.	Two profiles showed high and low TRAJ. High TRAJ was higher in inflammation.
Juengst et al. (2015)	Adult patients	Moderate to severe	Investigate if inflammation in the acute phase would predict late post-traumatic depression (PTD).	Higher cytokine levels in the acute phase were associated with PTD in 6 months. Inflammatory biomarker risk showed a trend association in 12 months with PTD.
Schneider Soares et al. (2012)	Adults patients (18-79 years old)	Severe	Evaluate the association between IL-10, TNF- $\alpha$ , and mortality.	IL-10 serum levels of patients correlated with Glasgow Come Scale scores and associated with mortality and severe TBI.
Hensler et al. (2000)	Adult patients	Severe (isolated, multiple injuries with and without isolation)	Evaluate the influence of additional injuries on systemic IL-10 and IL-13.	Within three hours after the lesion, IL-10 levels increased in all groups.

Fonte: Autor, 2021.



Table 2 – Summary of pre clinical studies and main outcomes addressing the effect of TBI on systemic inflammation from peripheral organs

<b>STUDY</b>	<b>TBI MO-DEL</b>	<b>SPE-CIES</b>	<b>PURPOSE</b>	<b>MAIN OUTCOMES</b>
Hanscom et al. (2021)	Moderate to severe controlled cortical impact (CCI)	Mice	Evaluate the immune and neuro-behavioral response in the face of a chemically-induced colitis 28 days after TBI.	Colitis caused systemic inflammation in all groups, showing increased levels of myeloid cells in the blood and spleen, as well as myeloid cells and lymphocytes in mesenteric lymph nodes. However, only the CCI and sham (craniotomy) groups with colitis showed an altered autonomic balance (more sympathetic tone over the vagal) that correlates with the exacerbated neuroinflammation and motor coordination, cognition, and social behavior deficits.
Saber et al. (2020)	Moderate fluid percussion injury (FPI)	Mice	Evaluate the inflammation and sleep differences in males and females.	Higher IL-6 levels in female TBI compared to males (77-124%). IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ levels did not present any difference between genders. Ly6G <sup>+</sup> neutrophils increased in male TBI measured in the blood (31–33%) and spleen (31%) compared to the female TBI. TBI increased sleep in both genders. However, male TBI increased sleep (11–17%) more than female TBI.
Morris et al. (2020)	Weight Drop	Mice	Verify if adverse effects of splenectomy in TBI patients occurred due to coagulative effects.	Splenectomy caused hypercoagulability in 6 h of damage, whereas from 24 h to 7 days, TBI/splenectomy presented a hypercoagulable state with elevated P-selectin expression.
Ritzel et al. (2019)	Moderate controlled cortical impact (CCI)	Mice	Evaluate the effects of age in post-traumatic microglial responses and	Aged mice presented more severe deficits and exhibited more robust microglial proliferation and higher numbers of brain-infiltrating leukocytes. Microglia in aged mice showed impairments in phagocytic

			functional outcomes.	activity and higher IL-1 $\beta$ production. Deficits of phagocytosis were observed in myeloid cells of aged TBI mice. In young mice, TBI-induced splenomegaly and splenic myeloid cell expansion were more pronounced.
Patel et al. (2019)	Mild controlled cortical impact (CCI)	Rat	Examine if exosomes are a novel and cell-free regenerative approach to long-term recovery after TBI.	Exosomes migrate in the spleen approximately one hour after systemic administration and enter the brain several hours after TBI.
Zhao et al. (2019)	Moderate controlled cortical impact (CCI)	Mice	Evaluate after TBI the role of the immune system in cardiac function.	Splenectomy reduces cardiac function impairment associated with decreased cardiac fibrosis, oxidative stress, cardiomyocyte apoptosis, and decreased infiltration of immune cells and inflammatory factor expression in the heart induced by TBI.
Ritzel et al. (2018)	Moderate controlled cortical impact (CCI)	Mice	Evaluate TBI effects in lymphoid organs.	Spleen weights significantly increased three days post-injury with an accumulation of Ly6C <sup>+</sup> monocytes and Ly6G <sup>+</sup> neutrophils in this organ, while the number of CD4 <sup>+</sup> T cells significantly increased 60 days after TBI.
Morganti et al. (2015)	Controlled cortical impact (CCI) (velocity: 4.0 m/s and 300 ms)	Mice	Evaluate temporal kinetics of CCR2 macrophage accumulation in the brain.	CCR2 antagonists reduced acute peripheral macrophage accumulation and prevented late learning and memory deficits.
Chu et al. (2013)	Severe focal cortical contusion (FCC)	Rat	Investigate the mechanisms of the spleen in brain inflammation.	Splenectomy decreased MAPK signaling in the brain induced by TBI <i>in vivo</i> . <i>In vitro</i> spleens of TBI rats increased MAPK and NF- $\kappa$ B activation, whereas IL-1R antagonist (IL-1Ra) blocked p38 and ERK pathways and decreased NF- $\kappa$ B.

Schwulst et al. (2013)	Weight drop	Mice	Determine temporal alterations after TBI of the peripheral immune system.	The loss of TBI-induced thymocytes, as well as blood monocytes, was significantly decreased since the beginning of the experiment. Monocytes were polarized towards an anti-inflammatory phenotype at 60 days post-injury. IL-12 expression decreased after the 14 <sup>th</sup> day post-injury.
Das et al. (2011)	Mild fluid percussion injury (FPI)	Rat	Identify CCL20 as both peripheral and central immune signals in the pathogenesis of TBI.	There is the presence of apoptotic cells and CD11b <sup>+</sup> microglia in the cortex, hippocampus, and thalamus. CCL20 expression was observed in the spleen and thymus 24 h after TBI. Splenectomy partially reduced the CCL20 in brain areas 48 h after TBI.
Li et al. (2011)	Severe focal cortical contusion (FCC)	Rat	Examine the effects of the spleen in the brain edema after TBI.	Splenectomy eliminated edema, decreased death rate, and reduced IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 content in the blood and mRNA expression in the brain. Spatial reference memory in TBI rats with splenectomy improved.
Walker et al. (2010)	Moderate-severe controlled cortical impact (CCI)	Rat	Evaluate if multipotent adult progenitor cells (MAPC) interact with splenocytes and protect the blood-brain barrier.	TBI caused loss of splenic mass, increased the number of immune cells circulating, and increased BBB permeability, while MAPC and resident CD4 <sup>+</sup> reduced the damage.

Fonte: Autor, 2021.



## 5 CAPÍTULO II

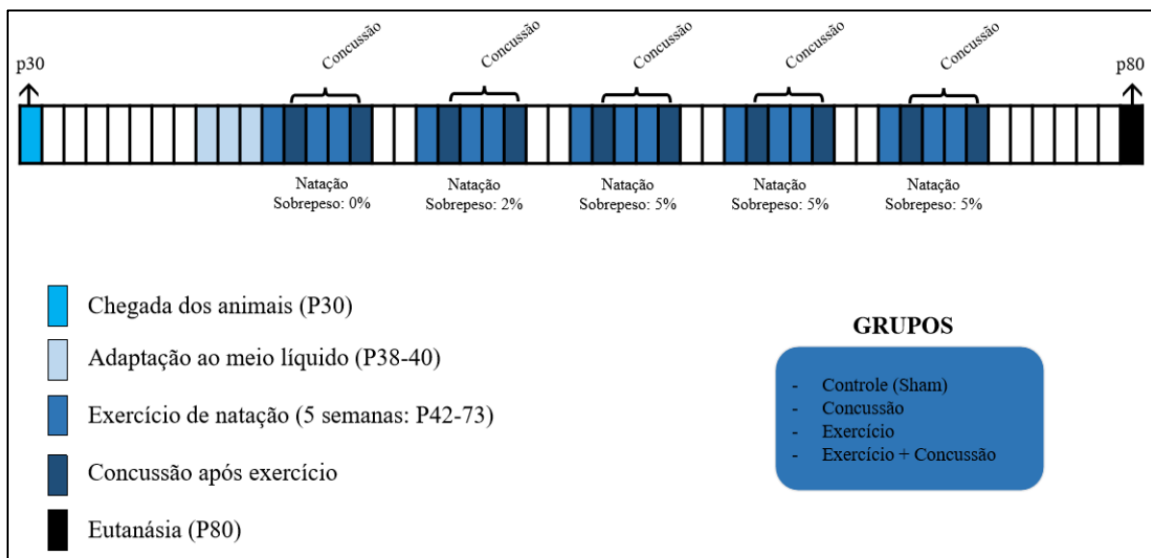
### 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar jovens machos (30 dias de idade), os quais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7h00 e 19h00), em temperatura de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ , com ração comercial e água *ad libitum*. Os mesmos permaneceram alojados em caixas de polipropileno de 41x34x16 cm, as quais possuem estrutura forte, com superfícies internas regulares, de fácil limpeza, resistente a água quente, detergentes e desinfetantes. A higiene das caixas foi controlada e a superlotação das mesmas evitada, mantendo no máximo 3 e no mínimo 2 animais por caixa. O presente trabalho foi aprovado de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 9334091219. Os reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA) e Bio-Rad. Todas as medidas foram tomadas para minimizar o estresse e reduzir o número de animais usados no experimento.

#### 5.1.2 Delineamento experimental

Figura 1 - Delineamento experimental



Fonte: Autor, 2021.

Os animais chegaram ao biotério com 30 dias de vida (P30), onde foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Controle Sedentário (C-S); Concussão Sedentário (CC-S), Controle Exercício (C-E) e Concussão Exercício (CC-E). Após passarem por oito dias de ambientação ao biotério, os animais passaram pela Adaptação ao Meio Líquido (AML) em uma piscina com 5cm de água (a 32°C), uma hora por dia durante 3 dias seguidos, do P38 ao P40. Desse modo, 24h após a última adaptação à água, os animais começaram o protocolo de natação de 5 dias de treino e 2 dias de descanso até completar as cinco semanas de treino (do P41 até o P73). Nesse protocolo, as concussões (CR) foram induzidas no segundo e quinto dia de cada semana de natação nos animais do grupo Concussão Sedentário (CC-S) e Concussão Exercício (C-E), totalizando 10 concussões ao fim do protocolo, induzidas nos dias P42, P45, P49, P52, P56, P59, P63, P66, P70 e P73. Como controle, existiu um limite de tempo de 2 minutos entre a saída do animal da piscina até o momento da indução da concussão no grupo Concussão Exercício. Os animais dos grupos Controle receberam o mesmo tratamento, exceto a concussão. A eutanásia foi realizada no P80, exatamente 7 dias após o último dia de natação e a última indução a uma concussão. Amostras de córtex, cólon proximal e baço dos animais foram coletadas para subseqüentes análises.

### **5.1.3 Indução de concussão recorrente por queda de peso**

O modelo de concussão recorrente foi o modelo de queda de peso livre baseado em Mannix et al. (2014), com modificações, sendo elas: foi utilizado um pequeno pedaço de pano sobre o crânio dos animais, para que não ocorresse contusão óssea, bem como houve a utilização de esponjas em pequenos pedaços abaixo do papel laminado, para que facilitassem o amortecimento dos animais após as concussões. Foi utilizado um peso de 54g, sob uma altura de 71,1cm, que caiu em queda livre na cabeça do animal. Antes da aplicação das concussões, foi utilizado lidocaína tópica na cabeça dos animais para minimizar a dor pós-traumática (MYCHASIUK et al., 2014). Para a indução da concussão, os animais foram anestesiados com isoflurano 2% e colocados sob um papel alumínio com pequenos cortes para facilitar o rompimento do papel no momento do impacto. Abaixo do papel alumínio havia pedaços de esponjas para amortecer a queda dos animais. Os animais receberam 10 concussões, duas vezes por semana durante cinco semanas seguidas, nos dias P42, P45, P49, P52, P56, P59, P63, P66, P70 e P73. Após cada concussão, os ratos foram alojados em uma caixa limpa para recuperação com luz para aquecê-los e evitar alguma possível hipotermia. Os animais do grupo Controle Sedentário e Controle Exercício passaram pelo mesmo processo, exceto a concussão.

### 5.1.4 Tempo de inconsciência

Após cada lesão, um cronômetro foi disparado para analisar o tempo que o animal permaneceu inconsciente. O retorno a consciência foi considerado quando o rato retornou à posição pro nada. Os animais do grupo controle passaram pelo processo de anestesia, mas não foram submetidos à lesão.

### 5.1.5 Protocolo de natação

O protocolo de exercício físico foi baseado em Cardoso et al. (2013), com modificações apenas no número de semanas. Os animais treinaram por 5 semanas. Como mostra a Tabela 2, na primeira semana as sessões são feitas sem carga extra, na segunda semana os animais treinaram com uma sobrecarga de 2% do peso corporal e, da terceira até a quinta semana o treino foi feito com sobrecarga de 5% do peso corporal. A temperatura da água foi mantida em  $32^{\circ}\text{C}\pm 1$  durante as sessões de treino. Em outros trabalhos, o protocolo no qual este foi baseado é caracterizado como um treinamento de baixa intensidade e longa duração, mostrando-se efetivo em aumentar a capacidade oxidativa muscular e sendo eficiente para promover adaptações centrais e periféricas em ratos, adaptações estas que são marcantes no treinamento físico aeróbio (CARDOSO et al., 2013).

Tabela 2 – Protocolo de exercício físico de natação. CC = carga corporal

Semana	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
1	20 minutos	30 minutos	40 minutos	50 minutos	60 minutos
	Sem carga	Sem carga	Sem carga	Sem carga	Sem carga
2	40 minutos	50 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
	2% da CC	2% da CC	2% da CC	2% da CC	2% da CC
3	40 minutos	50 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC
4	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC
5	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC	5% da CC

Fonte: (CARDOSO et al., 2013).

### 5.1.6 Preparo do tecido para as análises bioquímicas

Amostras teciduais foram coletadas, lavadas em água destilada e imediatamente congeladas em Nitrogênio Líquido sendo, posteriormente, armazenadas na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram então descongelados, homogeneizados em TRIS-HCl 30mM (pH=7,4) e centrifugados à 3000rpm por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ , o pellet, junto com a serosa (no caso das amostras de cólon) serão descartados e o sobrenadante será utilizado nas análises.

### 5.1.7 Determinação da atividade da enzima $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase

A atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPa se foi mensurada de acordo com Rambo et al. (2013) com adaptações. O meio de reação consistiu em 100mM de Tampão Tris-HCl (pH 7,4), 0,2mM de EDTA, 80mM de NaCl, 15mM de KCl, 6mM de MgCl e 21ug de proteína na presença e ausência de Ouabaína (3mM) com um volume final de 100uL. A reação foi iniciada com a adição de 3mM de Adenosina Trifosfato (ATP). Após 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , a reação foi parada com a adição de 25uL de Ácido Tricloroacético (70%). A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada no meio foi então quantificada pelo método colorimétrico descrito por Fiske and Subbarow (1927), e a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPa se calculada através da subtração dos valores obtidos da amostra com Ouabaína em relação à amostra sem Ouabaína. Os resultados foram expressos em nano mol de PI gerado por minuto por miligrama de proteína, conforme comparação com uma curva padrão de fosfato.

### 5.1.8 Atividade da enzima Acetilcolinesterase

A degradação da Ach no meio foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961) (ELLMAN et al., 1961). O meio contendo TFK (pH 7,4), 10uL de amostra diluída 1:5 em tampão Médium (Sacarose, Tris e EDTA), Foi pré-incubado à  $25^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e então foi adicionado DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) e Acetilcolina para iniciar a reação. As leituras foram feitas de 20 em 20 segundos por 5 minutos (mantendo a temperatura do leitor à  $25^{\circ}\text{C}$ ). O método é baseado na taxa de hidrólise da Acetilcolina (ACTI) pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412nm. A



intensidade da coloração é diretamente proporcional a quantidade de produto formado e, portanto, a degradação de Acetilcolina. O resultado final foi expresso em nmol de ACh hidrolisada por hora por mg de proteína.

#### **5.1.9 Determinação dos níveis de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Os níveis de TBARS foram determinados de acordo com Ohkawa ET AL. (1979), com algumas modificações. Após o tratamento das amostras com dodecyl sulfato de sódio (SDS) 8,1% e ácido acético 20% (pH= 3,5), o ácido tiobarbitúrico foi pipetado. Logo após, a mistura foi incubada à 100°C durante uma hora. Após o esfriamento e centrifugação dos tubos (3500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente), os níveis de TBARS da porção sobrenadante foram determinados espectrofotometricamente em comprimento de onda de 532 nm e expresso em uM de Malondialdeído (MDA) por miligrama de proteína conforme comparação com uma curva padrão feita com MDA.

#### **5.1.10 Capacidade Antioxidante Total (TAC)**

A Capacidade antioxidante Total foi feita como descrita por Maciejczyk et al. (2019).

#### **5.1.11 Análise por Western Blot**

Western Blot foi realizado de acordo com Funck et al. (2014) com pequenas modificações. Sendo assim, as amostras foram homogeneizadas a 4° C em tampão (RIPA-Buffer – Sigma Aldrich). Desta forma, os homogeneizados foram centrifugados a 12700 x g durante 12 min a 4° C, logo após a centrifugação o sobrenadante foi recolhido. Em seguida, a concentração de proteína de cada sobrenadante foi determinada pelo ensaio da proteína do ácido bicinoní-nico (Termo Fisher Scientific), e o  $\beta$ -mercaptonol adicionado nas amostras a uma concentração final de 8%. Todas as amostras foram ajustadas para conter a concentração de proteína de 2  $\mu$ g/1  $\mu$ L. Desta forma, foi utilizada uma quantidade de 15 $\mu$ L de amostra, contendo 30 $\mu$ g de proteína, submetida a uma eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida com 4% e 12% de concentração e transferidas para uma membrana de nitro celulose usando o sistema de transferência TransBlot® Turbo™, no qual a carga de proteína foi confirmada pela solução de Ponceau S

(Sigma Aldrich - P7170). Após o bloqueio com BSA 3%, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários específicos para a determinação das proteínas (Tabela 3).

Tabela 3 - Lista de anticorpos utilizados no trabalho

<b>Proteína</b>	<b>Tipo</b>	<b>Empresa</b>	<b>Código</b>	<b>Diluição</b>	<b>Incubação</b>
Nrf2	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-722	1:1000	Overnight
nAChRa7	Rabbit	Abcam	ab10096	1:500	Overnight
SOD2	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-137254	1:2000	Overnight
3-NT	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-55256	1:1000	Overnight
iNOS	Rabbit	BIORAD	AHP2399	1:1000	Overnight
AMPK	Rabbit	BIORAD	AHP2429	1:1000	Overnight
5-HT4R	Rabbit	SIGMA	SAB4501480	1:1000	Overnight

Fonte: Autor, 2021.

nAChRa7: Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 7; Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SOD2: Superoxide dismutase 2; 3-NT: 3-Nitrotyrosine; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase; 5-HT4R: 5-hydroxytryptamine 4 receptor.

Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T (TBS mais 0,1% Tween 20) duas vezes à temperatura ambiente por 10 min e incubadas com anti-rabbit (Sigma Aldrich - A6154) ou anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology - sc - 2005), anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (1: 10.000), por 2h à temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por quimiluminescência aumentada utilizando substrato ECL Western Blotting (Pierce ECL, BioRad) e os sinais foram capturados com o foto documentador ChemiDoc XRS + (BioRad). As bandas foram quantificadas usando o software ImageLab (Bio-Rad) e o Ponceau de cada membrana usado para corrigir a expressão de proteína encontrada. O resultado final de intensidade de sinal de cada banda foi expresso em % em relação ao controle.

### 5.1.12 Determinação da concentração de proteína nas amostras

O conteúdo protéico das amostras homogeneizadas em Tris-HCl foi mensurado colorimetricamente usando uma curva padrão de BSA (1 mg/mL) para comparação, usando Comassie Blue conforme Bradford (1976) (BRADFORD, 1976). Para amostras homogeneizadas em tampão com detergente, como no caso do RIPA, foi utilizado o método de mensuração de proteínas com ácido bicinonínico (Termo Fisher Scientific) em placa.

### 5.1.13 Imunohistoquímica

A fim de investigar a expressão de células gliais no córtex dos animais, os ratos foram anestesiados com tiopental (125mg/kg por via intraperitoneal) no dia P80, em seguida foi realizado a perfusão cardíaca com NaCl 0,9% contendo heparina (5ul/ml) e formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (PH 7,4). O encéfalo foi retirado e pós-fixado com PFA 4% por 24h. Após 24h os tecidos coletados foram colocados em sacarose 30% durante 3 dias e congelados com nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80 °C. Desta forma, foram realizadas séries de cortes com fatias de 35um em um criostato (Lupetec CM 2850 BRA). As amostras foram bloqueadas utilizando 5% BSA em 0,1 M de PBS contendo 0,25% de Triton X-100 (PBS-Tx) durante 2 h à temperatura ambiente. As fatias foram então incubadas 36h a 4°C com o anticorpo proteína glial fibrilar acídica de coelho (GFAP) (1: 1000; DAKO) em 2% de NGS diluído em PBS. Depois enxaguadas com 0,1 M de PBS e PBS-Tx, as fatias do tecido foram incubadas com comanti-rabbit (1:500 Sigma Aldrich - A6154) (em 0,25% PBS-Tx com 2% NGS durante 2 h a temperatura ambiente. As fatias foram lavadas, montadas em lâminas de microscópio e cobertas com suporte de montagem DPX (Sigma-Aldrich).

### 5.1.14 Análise estatística

Os dados serão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do Teste de Tukey foram usadas. Análise de variância de duas vias (ANOVA) de medidas repetidas foi utilizada na análise do tempo de inconsciência. Valores significativos serão considerados quando  $p < 0,05$ .

## 5.2 RESULTADOS

### 5.2.1 O Efeito de concussões recorrentes associadas à prática do exercício físico no tempo de inconsciência de ratos wistar

O tempo de inconsciência de animais após a indução de TCE em modelos experimentais tem sido usado como parâmetro de intensidade do traumatismo (MA, X. et al., 2019). Dessa forma, a análise estatística (Análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas) confirmou que o modelo de concussões utilizado no presente trabalho se caracteriza como um modelo de TCE leve/concussão, por não apresentar diferença estatística no tempo de inconsciência dos grupos [F (27,324) = 1.104; P = 0.3327 Figura 2]. Além disso, nenhuma alteração no padrão estrutural de imagem do encéfalo foi observada entre os grupos experimentais (Figura 3), outra característica de eventos concussivos (BLENNOW et al., 2016).

### 5.2.2 O Efeito 10 concussões associadas a prática de exercício físico de natação na lipoperoxidação, capacidade antioxidante e atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no cólon proximal

No presente trabalho, o modelo de concussões recorrentes induziu a lipoperoxidação nas membranas do tecido intestinal analisado quando comparado ao grupo Controle sedentário [F (1,22) = 6.993; P=0.0317 Figura 4A], assim como levou a diminuição da capacidade antioxidante total no tecido [F (1, 22) = 3.935; P = 0.0427 Figura 4B]. Em ambos os casos a prática concomitante de exercício físico limitou o efeito das concussões recorrentes. Quanto a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Figura 4C), a concussão não altera a sua atividade *per se*, entretanto, a prática de exercício físico promove um aumento na atividade dessa enzima quando comparado ao grupo concussão sedentário [F (1, 23) = 11.88; P = 0.0018] e esse efeito do exercício físico perdura mesmo quando combinado as concussões [F (1, 23) = 5.578; P = 0.0356].

### 5.2.3 Concussões recorrentes associadas a prática de natação modulam parâmetros do sistema colinérgico intestinal

O presente protocolo de concussões recorrentes induziu a um aumento na hidrólise de acetilcolina (Figura 5A) quando comparado aos grupos controle sedentário [F (1, 24) = 8.869;

$P = 0.0144$ ] e controle exercício [ $F(1, 24) = 7.822$ ;  $P = 0.0023$ ]. A prática de exercício físico combinada as concussões recorrentes foi efetiva para retornar os níveis de hidrólise de acetilcolina de volta em nível de controle ( $P = 0.0194$ ). O segundo parâmetro relacionado ao sistema colinérgico intestinal analisado foi a imunorreatividade do receptor nicotínico de acetilcolina Alfa 7 (nAChR  $\alpha 7$ ) (Figura 5B), presente principalmente em macrófagos intestinais. O presente protocolo de concussões recorrentes induziu a um aumento na expressão desse receptor quando comparado ao grupo Controle sedentário [ $F(1, 22) = 5.849$ ;  $P = 0.0494$ ] e tal efeito não é visto quando as concussões são combinadas com o protocolo de natação.

#### **5.2.4 Concussões recorrentes não induziram a um dano nitrosativo no cólon proximal**

Com o objetivo de investigar possíveis causas do dano a membrana plasmática visto com o aumento dos níveis de MDA, foi feita a análise da expressão por western blot da proteína iNOS (Figura 6A), onde não foi vista diferença nenhuma entre os grupos [ $F(1,22) = 1.28$ ;  $F(1,22) = 2.27$ ]. Nesse sentido, o protocolo de concussões recorrentes também não modulou a imunorreatividade da 3-NT, apesar da diferença estatística entre os grupos Concussão sedentário x Controle exercício [ $F(1,22) = 5.843$ ;  $P = 0.0377$  Figura 6B].

#### **5.2.5 Concussões recorrentes associadas a prática de exercício físico aumentam a expressão de Nrf2 mas não de SOD2 no cólon proximal**

O presente protocolo de concussões recorrentes e de exercício físico não alteram, sozinhas, a expressão da proteína Nrf2 no cólon proximal de ratos, entretanto, quando combinados induzem a um aumento significativo da sua expressão, em relação a todos os demais grupos [ $F(1, 22) = 21.1$ ;  $P < 0.0001$  x Controle sedentário;  $P = 0.0005$  x Concussão sedentário;  $F(1, 22) = 11.59$ ;  $P = 0.0037$  x Controle exercício; Figura 7A]. Entretanto, o aumento da expressão total da proteína Nrf2 não se correlacionou com a imunorreatividade de SOD2 (mitocondrial), que não apresentou alteração entre os grupos experimentais (Figura 7B).

#### **5.2.6 O exercício físico modula a expressão de AMPK e do receptor 5HT4R no cólon proximal de ratos**

O exercício físico de cunho aeróbico se caracteriza pelo aumento da expressão da proteína AMPK no músculo esquelético, e tal efeito foi encontrado no cólon proximal dos ratos

que passaram pelas 5 semanas de natação quando comparados ao grupo Controle sedentário [ $F(1,22) = 4.445$ ;  $P = 0.047$  Figura 8A]. Vale destacar que esse efeito é perdido quando o exercício físico é combinado com as concussões recorrentes. Quanto a expressão do receptor de serotonina 5HT4R (Figura 8B), o protocolo de exercício físico se mostrou efetivo em aumentar sua expressão no grupo Controle exercício quando comparado ao grupo Controle sedentário [ $F(1, 22) = 25$ ;  $P=0.0018$ ] e Concussão sedentário [ $F(1, 22) = 25$ ;  $P = 0.0046$ ]. O mesmo efeito permanece no grupo Concussão exercício, que mostra o mesmo aumento da imunorreatividade do receptor quando comparado aos grupos Controle sedentário [ $F(1, 22) = 25$ ;  $P = 0.0176$ ] e Concussão sedentário [ $F(1, 22) = 25$ ;  $P = 0.0443$ ].

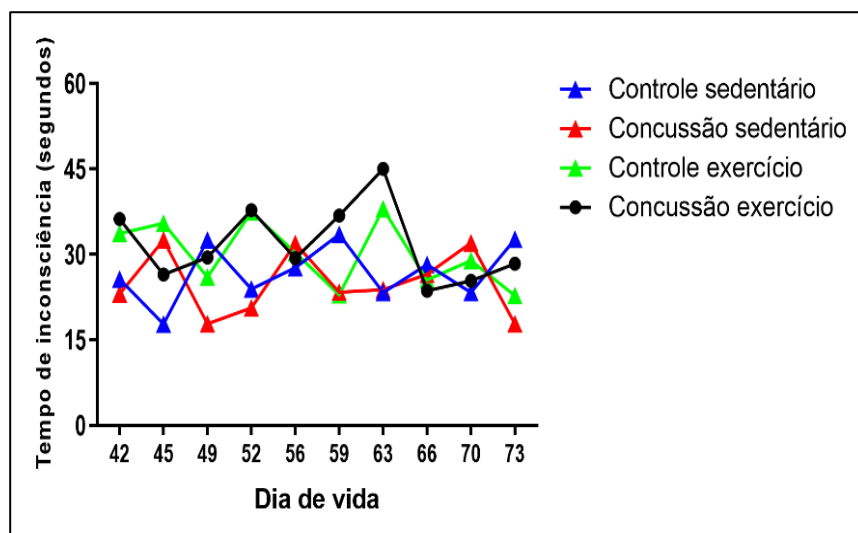
### **5.2.7 Concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico não alteram a imunorreatividade do receptor nAChR $\alpha$ 7 e da proteína Nrf2 no baço de ratos**

Nenhuma alteração na expressão da proteína Nrf2 foi encontrada nos grupos experimentais do presente trabalho [ $F(1, 22) = 0.1706$  Figura 9A], dissociando as respostas de diferentes órgãos frente ao mesmo protocolo. Da mesma forma, não houve nenhuma alteração na expressão do receptor nAChR $\alpha$ 7 [ $F(1, 22) = 1.571$  Figura 9B], oferecendo indícios de que não há mobilização de macrófagos no baço de ratos submetidos ao presente protocolo.

### **5.2.8 Concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico de natação não induzem a ativação de GFAP em regiões do córtex cerebral de ratos 7 dias após a última lesão**

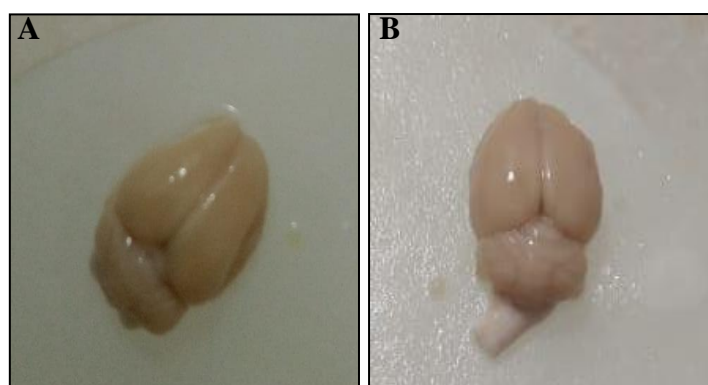
A fim de melhor compreender os efeitos do presente protocolo de concussões recorrentes, a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de astrócito ativado amplamente relacionado com danos ao SNC (KHAKH e SOFRONIEW, 2015; SOFRONIEW, 2009) foi aferida através da técnica de imuno-histoquímica em regiões do córtex cerebral. As regiões foram escolhidas por representarem aproximadamente a região do impacto do peso na indução da concussão. Dessa forma, encontramos que o protocolo de concussões utilizado não induziu, assim como nenhum outro grupo, a astrogliose nas regiões RSGc [ $F(1,12) = 0.6773$ ; Fig. 10A], RSD [ $F(1, 12) = 0.159$ ; Fig. 10B], MPtA [ $F(1, 12) = 0.4844$ ; Fig. 10C] e LPtA [ $F(1, 12) = 0.3281$ ; Fig. 10D] 7 dias após o último evento lesivo.

Figura 2 - Tempo de inconsciência dos animais, do momento em que ficam anestesiados até seu retorno à posição pronada. O Eixo Y nos mostra o tempo em que o rato permaneceu inconsciente, já o Eixo X apresenta o dia de vida dos animais quando foram submetidos ao processo de anestesia ou anestesia seguida de concussão. análise de variância de duas vias (anova) de medidas repetidas.



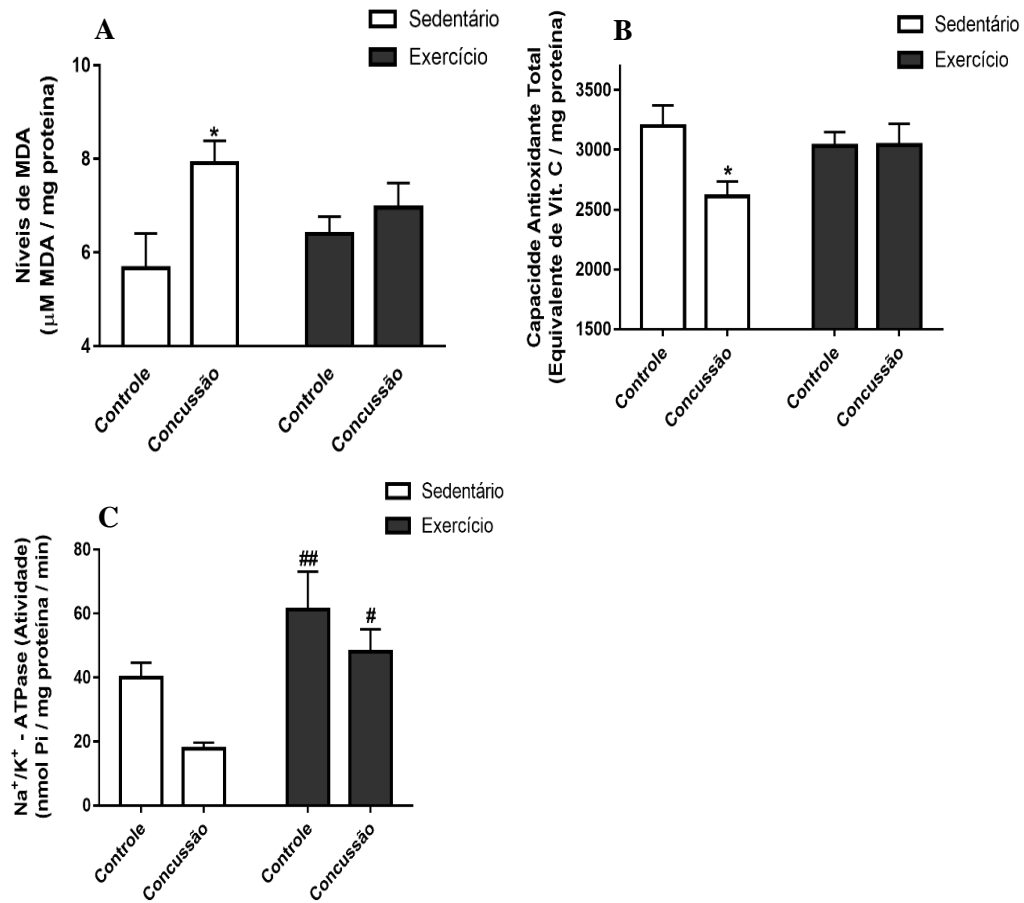
Fonte: Autor, 2021.

Figura 3 – Fotos demonstrativas do efeito de 10 concussões repetitivas no encéfalo de ratos: sem alteração no padrão estrutural de imagem, característica de concussões; (A) encéfalo de um animal do grupo controle sedentário e (B) encéfalo de um animal do grupo concussão sedentário



Fonte: Autor, 2021.

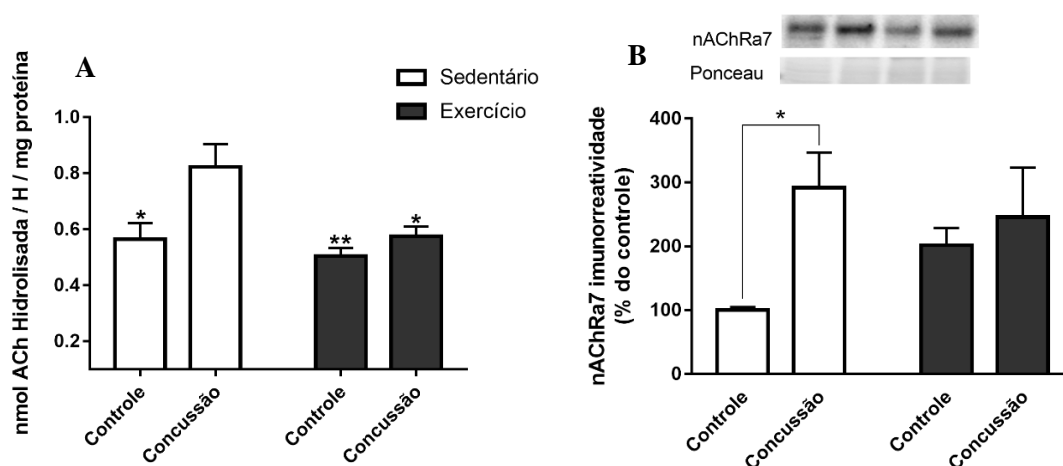
Figura 4 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico na lipoperoxidação (A), na capacidade antioxidante total (B) e na atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (C) no cólon proximal. Os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo. \* = P < 0.05 em relação ao grupo controle sedentário; # = P < 0.05 e ## = P < 0.001 em relação ao grupo concussão sedentário.



Fonte: Autor, 2021.

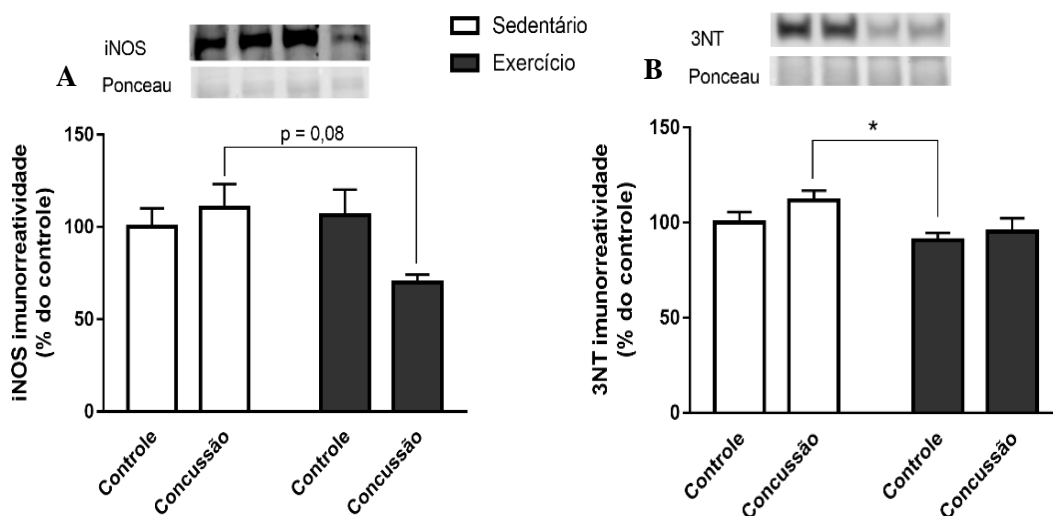


Figura 5 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico em parâmetros do sistema colinérgico do cólon proximal. **A)** atividade da enzima acetilcolinesterase intestinal; **B)** imunorreatividade do receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (nAChRa7) no cólon proximal; os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo.  $*=p<0.05$  em relação ao grupo concussão sedentário;  $**=p<0.005$  em relação ao grupo concussão sedentário.



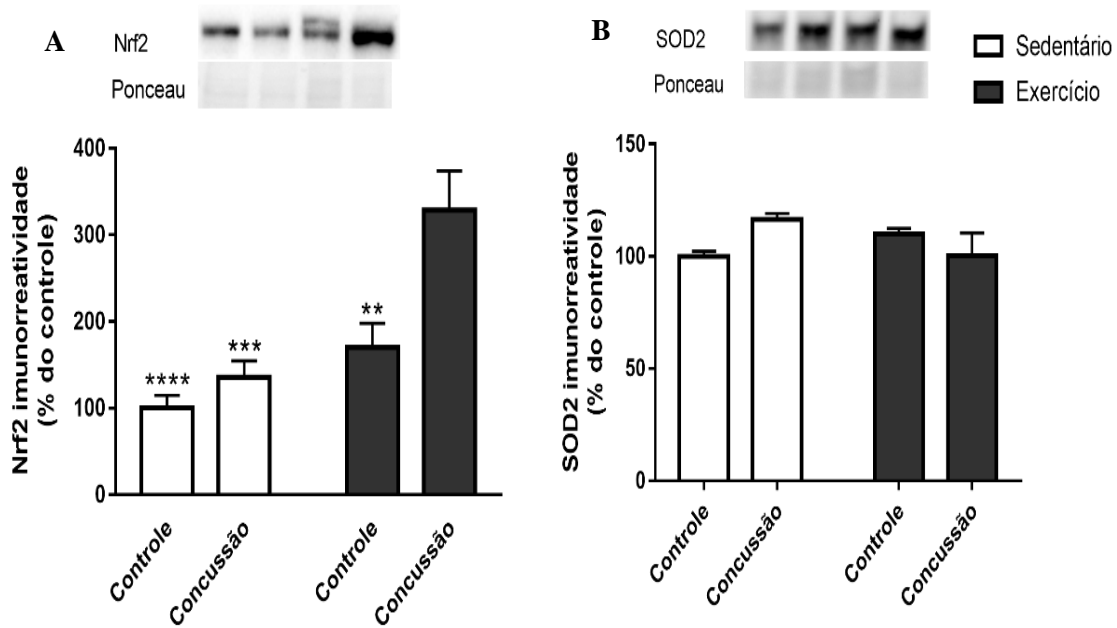
Fonte: Autor, 2021.

Figura 6 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico no estado nitrosativo intestinal: **A)** imunorreatividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (inos); **B)** imunorreatividade da nitrosilação proteica intestinal; os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo.  $*=p<0.05$  em relação ao grupo concussão sedentário;



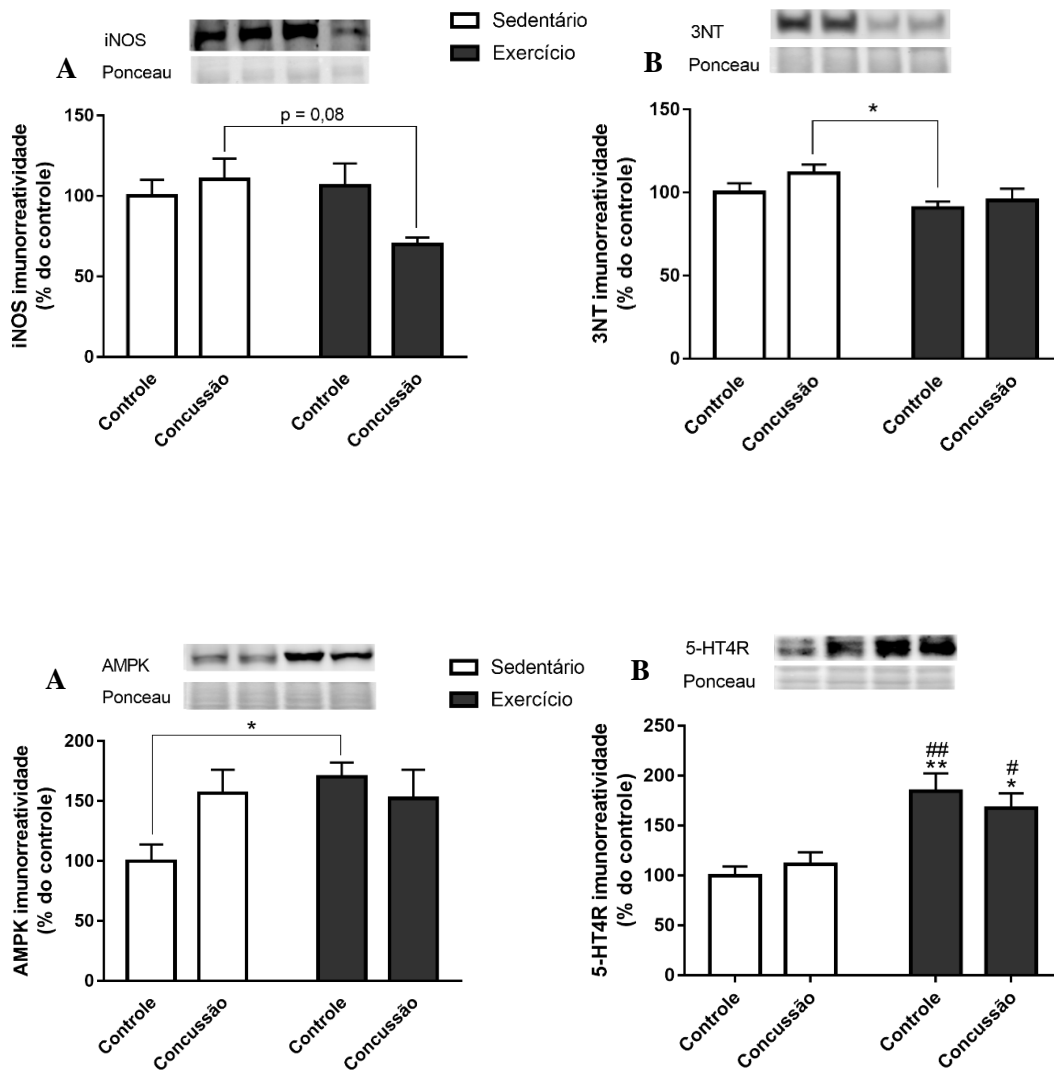
Fonte: Autor, 2021.

Figura 7 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico sobre parâmetros antioxidantes intestinais. **A)** imunorreatividade da proteína Nrf2; **B)** imunorreatividade da enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) no cólon proximal; os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo. \*\*= $P < 0.005$ ; \*\*\*= $P \leq 0.0005$  E \*\*\*\*= $P \leq 0.0001$  em relação ao grupo concussão exercício.



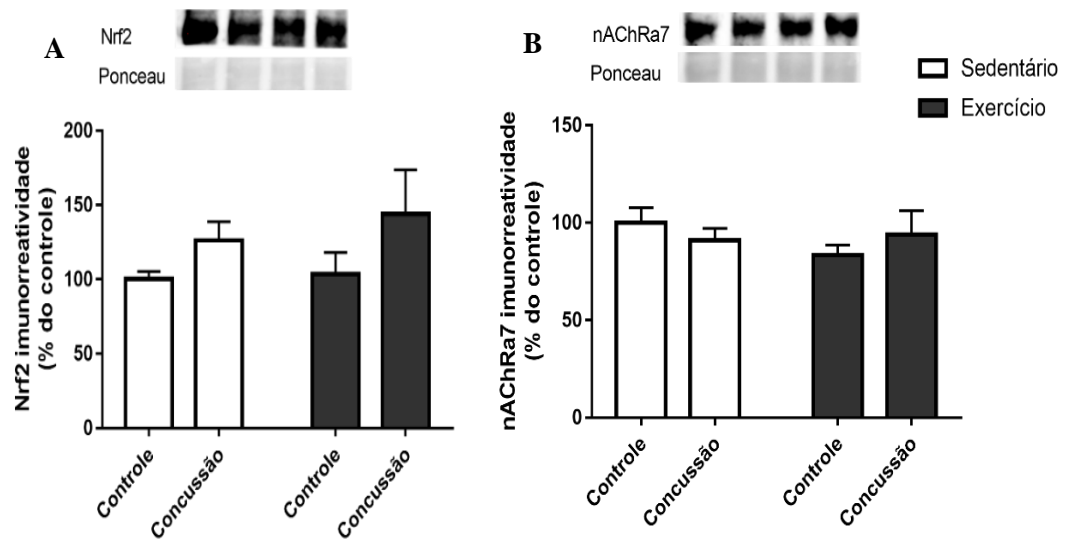
Fonte: Autor, 2021.

Figura 8 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína AMPK (A) e do receptor 5-HT4R (B) no cólon proximal. Os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo.  $*=p<0.05$  e  $**=p<0.01$  em relação ao grupo controle sedentário;  $\#=p<0.05$  e  $\#\#=p<0.01$  em relação ao grupo concussão sedentário



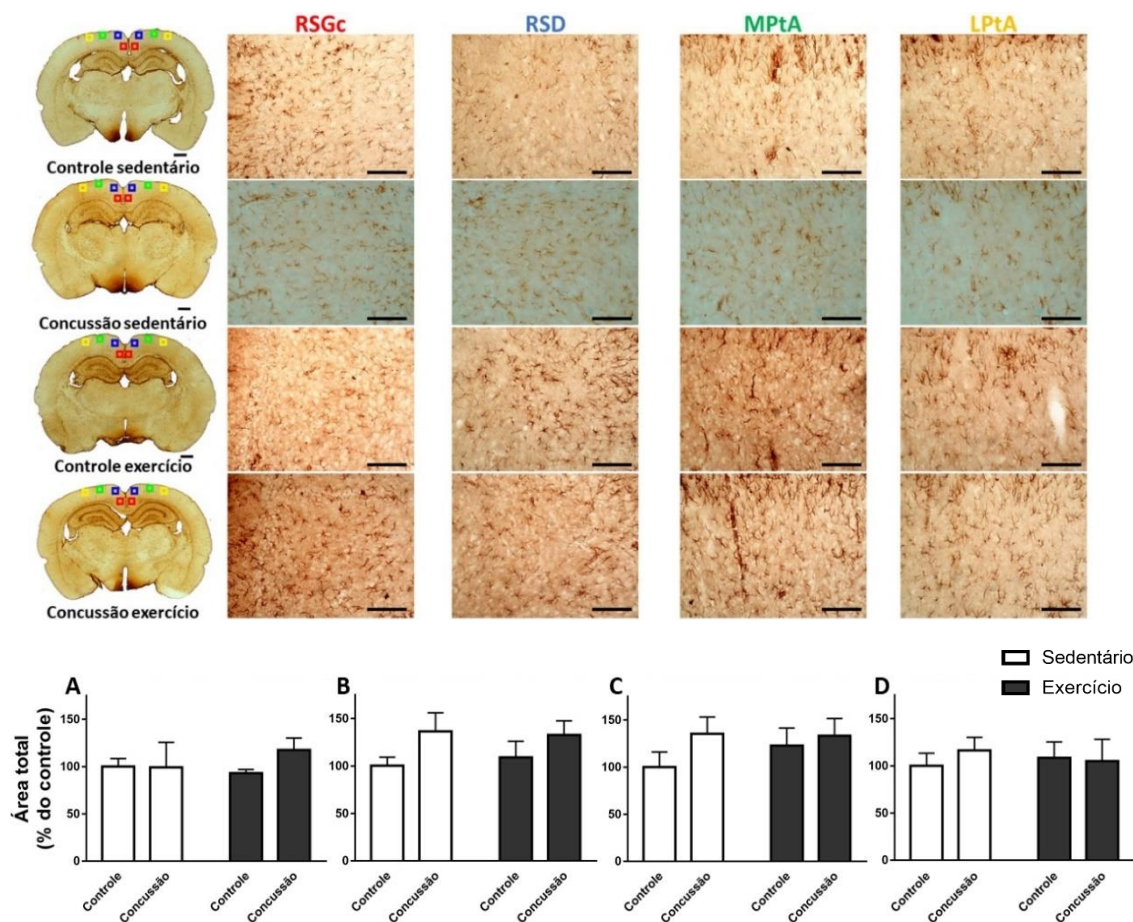
Fonte: Autor, 2021.

Figura 9 - Influência de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Nrf2 (A) e do receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (nAChR  $\alpha 7$ ) (B) no baço. os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há de 6 a 7 animais por grupo.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 10 - Efeito de concussões recorrentes associadas à prática de exercício físico sobre a expressão de GFAP em regiões superficiais do córtex cerebral: **A)** Retrosplenial granular cortex, região C (RSGc) em vermelho; **B)** Retrosplenial dysgranular cortex (RSD) marcado na cor azul; **C)** Medial parietal cortex (MPtA) na cor verde; **D)** *lateral parietal association cortex* (LPtA) em amarelo. Os dados apresentam a média e o erro padrão da média (sem) sendo que há 4 animais por grupo (anova de duas vias).



Fonte: Autor, 2021.

### 5.3 DISCUSSÃO

A concussão é um problema de saúde pública real, e seu grande perigo é a sutilidade de seus efeitos, bem como o desconhecimento de todos os seus mecanismos (TAGGE et al., 2018). No presente trabalho, utilizamos um modelo experimental de concussões recorrentes, por queda livre de peso, associado à prática de exercício físico durante a fase jovem de vida de ratos Wistar para analisar se o dano secundário é capaz de atingir o cólon proximal, baço e regiões superficiais do córtex cerebral destes animais, uma vez que existem indícios na literatura de que danos periféricos podem colaborar com a progressão do dano secundário central do TCE e com o

desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SUNDMAN et al., 2017a). O modelo de indução às concussões utilizado no presente trabalho correspondeu aos padrões estabelecidos na literatura para ser caracterizado como um traumatismo cranioencefálico leve ou concussão, por não apresentar diferença estatística no tempo de inconsciência dos animais dos grupos controle e concussão (MA, X. et al., 2019), assim como por não apresentar alterações no padrão estrutural de imagem visível no encéfalo dos animais submetidos aos dez TCE (BLENNOW et al., 2016).

No presente trabalho encontramos um aumento nos níveis de MDA no cólon proximal induzida pelas concussões recorrentes nos animais sedentários, denotando um aumento na peroxidação lipídica. Tal efeito das concussões foi limitado pela prática de exercício físico nos animais do grupo Concussão Exercício. Já é documentado pela literatura que o estresse oxidativo está envolvido na progressão dos danos intestinais induzidos pelo TCE (JIN et al., 2010; SHOHAMI et al., 1999). Vale destacar que um desequilibrado e persistente estado de estresse oxidativo está associado com a progressão de diversas patologias intestinais (AVIELLO; KNAUS, 2017; STOJILJKOVIC et al., 2009). Corroborando com esse dado encontrado, foi visto que a capacidade antioxidante total do cólon proximal se encontra diminuída nos animais do grupo concussão sedentário, em uma relação inversa ao que foi visto nos níveis de MDA. Da mesma forma, a combinação das concussões com o protocolo de exercício limitou esse dano. Sendo assim, temos um indício de que as concussões recorrentes geram um desequilíbrio nas defesas antioxidantes intestinais, o que pode levar à perda da integridade da mucosa, aumentando a permeabilidade intestinal, assim como também pode mediar a geração de uma resposta inflamatória.

Entretanto, pelos resultados obtidos, esse dano não ocorre através de um desbalanço de ERN, uma vez que não houve alteração nos resultados da expressão da enzima iNOS e nem da 3-NT, indicando que não há dano nitrosativo induzido pelo nosso modelo de concussões a nível intestinal (cólon proximal). Dessa forma, um dos próximos passos do trabalho é investigar a origem desse dano, que pode ser tanto por disfunção mitocondrial causado por isquemia e reperfusão intestinal, assim como pode ser devido a sinalização de inflamação no intestino, uma vez que um dos resultados da inflamação ativa no intestino é a conversão de moléculas de oxigênio em ERO por células imunes, como a atividade da Mieloperoxidase em neutrófilos (BEDARD; KRAUSE, 2007). Vale ressaltar que esse uso exacerbado de  $O_2$  por parte das células imunes pode gerar um ambiente de hipoxia no tecido, levando também à disfunções mitocondriais (BEDARD; KRAUSE, 2007; CAMPBELL; COLGAN, 2019).

É proposto que a resposta a danos no intestino e também a inflamação à nível sistêmico se dá através da ativação do arco reflexo anti-inflamatório colinérgico, e que o baço pode intermediar essa resposta. Nesse sentido, investigamos no baço a expressão do receptor nAChR  $\alpha 7$  e de Nrf2, uma das proteínas finais da via sinalizada pela ativação desse receptor. Entretanto, nenhuma alteração foi encontrada entre os grupos experimentais no presente trabalho. Nesse sentido, vale destacar que achados recentes indicam que pode ocorrer a resposta anti-inflamatória colinérgica direta do nervo vago no intestino, assim como há indícios de que o próprio SNE seria capaz de sintetizar e liberar ACh no meio, com o objetivo de responder a insultos inflamatórios. Corroborando com isso, o presente trabalho mostrou um aumento na expressão de nAChR  $\alpha 7$  no cólon proximal induzida apenas no grupo concussão sedentário, o que pode ser interpretado como uma resposta compensatória ao dano intestinal induzido pelo protocolo, uma vez que o receptor é principalmente expresso em macrófagos intestinais. Da mesma forma, as concussões recorrentes também induziram a um aumento na atividade da Acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela degradação da ACh na fenda sináptica e que tem seu aumento de atividade na periferia apontado como um marcador de inflamação (CARDOSO et al., 2014). Tais achados podem ser interpretados como um aumento da descarga colinérgica por parte do SNC através do arco reflexo colinérgico, tanto como do SNE, no intuito de combater o dano local induzido pelas concussões recorrentes nos animais sedentários, e que tal dano não foi, ou ainda não é, suficiente para desencadear uma resposta anti-inflamatória colinérgica a nível sistêmico, a ponto de modular o baço.

A atividade aumentada da acetilcolinesterase no cólon pode ser analisada através de dois pontos de vista: I) pode indicar uma alta liberação/ligação de ACh em seus receptores para combater a inflamação local ou II) pode estar prejudicando a ligação da ACh com seus receptores. O que nos sugere que a atividade aumentada da AChE no cólon proximal pode estar impedindo a ligação do neurotransmissor com seus receptores e a resposta anti-inflamatória, é a tendência da diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+ - \text{ATPase}$  no grupo concussão sedentário, uma vez que já é bem estabelecido pela literatura que o aumento da ligação da acetilcolina com seus receptores nicotínicos e muscarínicos no intestino levam a um aumento da atividade dessa enzima (AGRAWAL et al., 2020; BADER et al., 2017), já que todo o balanço de processos absorptivos e secretórios de íons dependem da  $\text{Na}^+\text{K}^+ - \text{ATPase}$  da MBL (RAO, 2011).

Na literatura, o uso de inibidores da enzima AChE e/ou agonistas do receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7, como é o caso dos fármacos Galantamina e Pyridostigmine, tem se demonstrado efetivo no tratamento de modelos de inflamação intestinal, como a colite ulcerativa e também de doença de chron (WAZEA et al., 2018). O presente protocolo de exercício físico,

quando combinado com as concussões, foi capaz de reverter a atividade da enzima acetilcolinesterase em nível de controle, bem como de aumentar a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase quando comparados os grupos concussão exercício e concussão sedentário. Tais resultados concordam com as propostas anteriores e fortalecem os indícios de atuação do exercício físico na proteção/limitação das alterações induzidas pelas concussões recorrentes no cólon proximal, uma vez que animais do grupo Concussão Exercício não tiveram o mesmo aumento na lipoperoxidação e nem da expressão de receptores nicotínicos de acetilcolina alfa7 como os animais do grupo concussão sedentário.

O presente protocolo de natação aplicado foi capaz de aumentar, *per se*, a expressão total da proteína AMPK, demonstrando que um efeito clássico do exercício físico de cunho aeróbico no músculo esquelético (PENGAM et al., 2020) também ocorre no intestino. Porém, tal efeito de aumento da AMPK é perdido quando combinado com a concussão. Da mesma forma demonstramos, pela primeira vez na literatura, que o exercício físico aumenta a expressão do 5-HT4R no cólon proximal de ratos, e que esse aumento não é perdido quando combinado com as concussões recorrentes. O papel do neurotransmissor 5-HT é fundamental para a integração dos movimentos secretórios e o trânsito intestinal, atuando através dos receptores 5HT3R e 5HT4R (RAO, 2011). Mais especificamente, o 5HT4R tem sido amplamente apontado como o principal receptor por onde a serotonina desempenha seu papel benéfico no intestino (AGRAWAL et al., 2020). Estudos recentes em modelos animais apontam um papel chave desse receptor não apenas nos movimentos gastrointestinais, mas também na neurogênese e sobrevivência dos neurônios entéricos (LIU et al., 2009), e o uso de agonistas de 5HT4R demonstram uma redução da inflamação intestinal após cirurgias em camundongos por estimular a atividade colinérgica no intestino (STAKENBORG et al., 2019). Além disso, esse receptor vem sendo apontado como um possível alvo terapêutico para o tratamento de disfunções gastrointestinais associadas à depressão (AGRAWAL et al., 2020). O achado do presente trabalho aponta mais um possível mecanismo de ação dos benefícios do exercício físico, e suporta a ideia de uso do exercício como uma intervenção não farmacológica para o tratamento de morbidades intestinais. Além disso, o aumento da expressão do 5HT4R pode estar por trás do aumento da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, justamente por esse receptor mediar movimentos de contração/relaxamento, levando a troca de eletrólitos no intestino (AGRAWAL et al., 2020; RAO, 2011).

Entretanto, somente no grupo Concussão Exercício foi observado o aumento expressivo da proteína Nrf-2 total no cólon proximal, e isso se deu em relação a todos os outros grupos



experimentais. O Nrf-2 é um importante fator de transcrição, que quando fosforilado é translocado ao núcleo celular para sinalizar a transcrição de enzimas antioxidante endógenas em resposta ao estresse oxidativo (MALLARD et al., 2020). Em modelos experimentais de TCE, a presença do Nrf-2 no intestino é apontada como de extrema importância para a limitação de danos inflamatórios e lesivos na mucosa, como foi demonstrado por Jin et al. (2008) ao usar camundongos que não expressavam o fator de transcrição Nrf-2 (JIN et al., 2008). Ao fazer uso de Tert-Butylhydroquinona (tBHQ), um composto que exerce um grande efeito antioxidante através da promoção da translocação do Nrf2 para o núcleo, Jin et al (2009) mostrou que a ativação do Nrf-2 protege a mucosa intestinal do jejuno, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias bem como o processo de apoptose, e inibindo a ativação do fator de transcrição NF-kB (JIN et al., 2009).

É importante ressaltar que o resultado obtido no presente trabalho se refere apenas ao aumento da expressão total do Nrf-2, sem definir o quanto desse total está fosforilado/no núcleo. Além disso, no presente trabalho não foi encontrada alteração significativa na expressão da enzima antioxidante SOD2, que é uma das enzimas que o Nrf-2 sinaliza para transcrever quando realiza sua ação no núcleo (MALLARD et al., 2020). Entretanto, vale ressaltar que esse aumento do Nrf-2 total, assim como todos os outros resultados, é visto 7 dias após a última indução à concussão e de realização do protocolo de natação, evidenciando que esse aumento na expressão total do Nrf-2 persiste no intestino desses animais.

Os achados do presente trabalho podem indicar que o exercício físico combinado a concussões, no nosso modelo de concussões e de janela de tempo entre as mesmas, induz a uma melhora na capacidade de neutralizar as ERO em situações de dano no cólon proximal, e que essa proteção evita alterações no sistema colinérgico entérico, bem como pode ser mediada pelo aumento da expressão de Nrf-2 total, possibilitando o aumento da sua fosforilação em momentos de estresse, o que pode explicar a limitação da lipoperoxidação e a manutenção da capacidade antioxidante total no grupo concussão exercício. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para melhor elucidar os mecanismos por trás desse aumento da expressão do Nrf-2, bem como o desfecho desses efeitos em outras vias de comunicação entre cérebro e intestino após episódios recorrentes de concussões. Ressaltamos também a importância de maiores estudos sobre diferentes janelas de tempo entre as concussões no contexto de prática de exercícios.

Forças mecânicas induzidas pelo TCE no encéfalo, como a tensão de cisalhamento, podem ativar mecanorreceptores em astrócitos, ocasionando o influxo de cálcio e a secreção de glutamato e ATP. Essa reação ativa o astrócito e inicia a sinalização para o recrutamento de outras células imunes para o local do dano. O astrócito reativo de forma aguda é importante na

cicatrização do dano tecidual, mas quando hiperativado, principalmente de forma crônica, apresentam uma resposta neuroinflamatória maléfica, bem relacionada com a fisiopatologia das concussões recorrentes. O resultado encontrado no presente trabalho vai de encontro com o achado de Angoa-Pérez et al. (2020) que mostra que, de forma aguda, 20 concussões recorrentes (1 por dia) não alteram a reatividade de astrócitos em camundongos. Entretanto, no trabalho citado, os sinais de ativação patológica de astrócitos se desenvolveram com o tempo, mostrando diferença estatística 45 dias após o fim das concussões recorrentes e se mantendo assim até 90 dias após (ANGOA-PÉREZ et al., 2020). Isso nos oferece indícios de que as alterações a nível intestinal induzidas pelas concussões recorrentes encontradas no presente trabalho podem se manifestar sem que ocorram alterações na ativação de astrócitos em camadas superficiais do córtex cerebral até 7 dias após a última concussão. Os presentes achados dissociam os efeitos de concussões recorrentes e do exercício físico em diferentes órgãos, e podem ampliar os horizontes na busca de novos marcadores para a concussão, assim como o entendimento da janela de vulnerabilidade a um novo insulto em órgãos periféricos.

## 6 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados parciais deste presente estudo revelaram que as concussões recorrentes por queda livre de peso induzidas na fase jovem de vida de ratos wistar são capazes de alterar parâmetros bioquímicos e moleculares no cólon proximal dos mesmos sem que ocorram alterações no nível de córtex cerebral e o envolvimento do baço na resposta ao dano, e que a combinação das concussões com o exercício físico é capaz de modular positivamente algumas dessas alterações induzidas no cólon. O modelo de concussões utilizado induziu a um aumento na lipoperoxidação, na expressão de nAChR  $\alpha 7$  assim como na atividade da enzima Acetilcolinesterase no cólon. Entretanto, o mesmo protocolo não foi capaz de modular *per se* a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, a expressão das proteínas NRF2, AMPK e SOD2, bem como não exerceu efeito sobre o estado nitrosativo intestinal, avaliado através da expressão de 3-NT e iNOS.

O protocolo de exercício físico utilizado se mostrou eficiente em aumentar *per se* a expressão da proteína AMPK, e, quando combinado as concussões, evitou um aumento dos níveis de MDA, bem como do receptor colinérgicos analisado, além de reverter o aumento da atividade da acetilcolinesterase e evitar a queda da capacidade antioxidante total. Além disso, animais que sofreram concussão e praticaram exercício físico mostraram um aumento da expressão do receptor 5HT4R e na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATP-ase em relação aos sedentários que sofreram concussões, e também um aumento na expressão da proteína Nrf-2 em relação a todos os grupos experimentais. Tais achados indicam que o dano secundário de concussões recorrentes não se limita apenas ao SNC, e que as alterações a nível intestinal podem preceder danos ao córtex, o que pode mudar a forma de ver a janela de vulnerabilidade a um segundo insulto e o tempo de retorno a práticas esportivas que envolvem o risco de concussões, uma vez que não apenas o cérebro pode ser alvo dos danos. Além disso, a prática regular de exercício físico diminui o tempo da janela de vulnerabilidade do intestino, para um novo insulto.

Por fim, a compreensão de como as concussões recorrentes afetam, não só o SNC, mas também órgãos periféricos, como o cólon proximal e o baço, pode ser uma nova alternativa para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para o dano secundário e de possíveis doenças psiquiátricas e neurológicas induzida por traumas repetitivos, sendo necessário que mais estudos sejam feitos a fim de ajudar na compreensão da comunicação que existe entre concussões-cérebro-periferia.



## REFERÊNCIAS

- AAD, G. et al. Measurements of the Total and Differential Higgs Boson Production Cross Sections Combining the  $H \rightarrow \gamma\gamma$  and  $H \rightarrow ZZ^{*} \rightarrow 4l$  Decay Channels at  $\sqrt{s}=8$  TeV with the ATLAS Detector. **Phys Rev Lett**, v. 115, n. 9, p. 091801, Aug 28 2015.
- ABRAHAM, D. et al. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: role of microbiome. **Experimental Gerontology**, v. 115, p. 122-131, 2019.
- 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.
- AGRAWAL, L. et al. Therapeutic potential of serotonin 4 receptor for chronic depression and its associated comorbidity in the gut. **Neuropharmacology**, v. 166, p. 107969, 2020.
- AGUDELO, L. Z. et al. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$ 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 33-45, 2014.
- AL-SADI, R. et al. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e85345, 2014.
- AMMAR, A. et al. Effects of COVID-19 home confinement on eating behaviour and physical activity: results of the ECLB-COVID19 international online survey. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1583, 2020.
- ANDRADE, A. F. D. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 75-81, 2009.
- ANDRIESSEN, T. M. et al. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 2381-2392, 2010.
- ANGOA-PEREZ, M. et al. Repetitive, mild traumatic brain injury results in a progressive white matter pathology, cognitive deterioration, and a transient gut microbiota dysbiosis. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 8949, Jun 2 2020.
- ANGOA-PÉREZ, M. et al. Repetitive, mild traumatic brain injury results in a progressive white matter pathology, cognitive deterioration, and a transient gut microbiota dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

ANTHONY, D. C. et al. The systemic response to brain injury and disease. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, n. 4, p. 534-540, 2012a.

ANTHONY, D. C. et al. The systemic response to brain injury and disease. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 4, p. 534-40, May 2012b.

ARCHER, T. Influence of physical exercise on traumatic brain injury deficits: scaffolding effect. **Neurotoxicity research**, v. 21, n. 4, p. 418-434, 2012.

ARRIETA, M.-C. et al. Alterations in intestinal permeability. **Gut**, v. 55, n. 10, p. 1512-1520, 2006.

ASGHAR, M. et al. Exercise decreases oxidative stress and inflammation and restores renal dopamine D1 receptor function in old rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 293, n. 3, p. F914-F919, 2007.

AVIELLO, G.; KNAUS, U. G. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 12, p. 1704-1718, Jun 2017.

BADER, S. et al. Stimulation of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-pump currents by epithelial nicotinic receptors in rat colon. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 9, p. 880-892, May 2017.

BALK, R. A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) Where did it come from and is it still relevant today? **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 20-26, 2014.

BANSAL, V. et al. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 8, p. 1353-9, Aug 2009.

BANSAL, V. et al. The hormone ghrelin prevents traumatic brain injury induced intestinal dysfunction. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 12, p. 2255-60, Dec 2010.

BARKHOUDARIAN, G. et al. The molecular pathophysiology of concussive brain injury—an update. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, v. 27, n. 2, p. 373-393, 2016a.

BARKHOUDARIAN, G. et al. The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury - an Update. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 27, n. 2, p. 373-93, May 2016b.

BARNES, J. N. Exercise, cognitive function, and aging. **Adv Physiol Educ**, v. 39, n. 2, p. 55-62, Jun 2015.

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

BARTON, W. et al. The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. **Gut**, v. 67, n. 4, p. 625-633, 2018.

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

BENTLAGE, E. et al. Practical recommendations for maintaining active lifestyle during the COVID-19 pandemic: a systematic literature review. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 17, p. 6265, 2020.

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

BINDER, E. et al. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. **Behav Brain Res**, v. 155, n. 2, p. 197-206, Dec 6 2004.

BLASER, M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 393-4, Aug 24 2011.

BLENNOW, K. et al. Traumatic brain injuries. **Nature Reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2016.

BOGOSLOVSKY, T. et al. Increases of plasma levels of glial fibrillary acidic protein, tau, and amyloid  $\beta$  up to 90 days after traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 34, n. 1, p. 66-73, 2017.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-62, May 25 2000.

BOTEZELLI, J. D. et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. **Sci Rep**, v. 6, p. 31106, Aug 04 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRICKSON, S. et al. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 3, p. 969-976, 2003.

BROCK-UTNE, J. G. et al. Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. **S Afr Med J**, v. 73, n. 9, p. 533-6, May 7 1988.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806-818, 2013.

BRYAN, M. A. et al. Sports-and recreation-related concussions in US youth. **Pediatrics**, v. 138, n. 1, 2016.

BUDDE, H. et al. The need for differentiating between exercise, physical activity, and training. **Autoimmun Rev**, v. 15, n. 1, p. 110-1, Jan 2016.

CAMILETTI-MOIRÓN, D. et al. High-intensity exercise modifies the effects of stanozolol on brain oxidative stress in rats. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 12, p. 984-991, 2015a.

CAMILETTI-MOIRÓN, D. et al. High-protein diet induces oxidative stress in rat brain: protective action of high-intensity exercise against lipid peroxidation. **Nutricion hospitalaria**, v. 31, n. 2, 2015b.

CAMPBELL, E. L.; COLGAN, S. P. Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 2, p. 106-120, Feb 2019.

CAMPBELL, J. P. et al. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 6, p. 767-75, Aug 2009.

CAMPBELL, J. P.; TURNER, J. E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **Front Immunol**, v. 9, p. 648, 2018.

CAPLAN, B. et al. Chronic inflammation after severe traumatic brain injury: characterization and associations with outcome at 6 and 12 months postinjury. **Journal of Head Trauma Rehabilitation**, v. 30, n. 6, p. 369-381, 2015.

CAPLAN, H. W. et al. Human cord blood-derived regulatory T-cell therapy modulates the central and peripheral immune response after traumatic brain injury. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 9, n. 8, p. 903-916, 2020.

CARDOSO, A. M. et al. Swimming training prevents alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v. 27, n. 4, p. 522-9, Apr 2014.



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.

CASPERSEN, C. J. et al. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, Mar-Apr 1985.

CERDA, B. et al. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? **Front Physiol**, v. 7, p. 51, 2016.

CHABAN, V. et al. Systemic Inflammation Persists the First Year after Mild Traumatic Brain Injury: Results from the Prospective Trondheim Mild Traumatic Brain Injury Study. **J Neurotrauma**, v. 37, n. 19, p. 2120-2130, Oct 1 2020.

CHAI, X. Y. et al. Investigation of nerve pathways mediating colorectal dysfunction in Parkinson's disease model produced by lesion of nigrostriatal dopaminergic neurons. **Neurogastroenterology & Motility**, p. e13893, 2020.

CHALLIS, C. et al. Gut-seeded  $\alpha$ -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 327-336, 2020.

CHAVAN, S. S. et al. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 927-942, Jun 20 2017.

CHEN, C.-W. et al. Attenuation of exercise effect on inflammatory responses via novel role of TLR4/PI3K/Akt signaling in rat splenocytes. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 4, p. 870-877, 2016.

CHEN, H. et al. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 7, p. 810-816, 2007.

CHEN, X. et al. Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. **Neuroscience**, v. 266, p. 235-243, 2014.

CLARK, A.; MACH, N. The crosstalk between the gut microbiota and mitochondria during exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 319, 2017a.

CLARK, A.; MACH, N. The Crosstalk between the Gut Microbiota and Mitochondria during Exercise. **Front Physiol**, v. 8, p. 319, 2017b.

COBB, B. R. et al. Head impact exposure in youth football: elementary school ages 9–12 years and the effect of practice structure. **Annals of biomedical engineering**, v. 41, n. 12, p. 2463-2473, 2013.

CODELLA, R. et al. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Dig Liver Dis**, v. 50, n. 4, p. 331-341, Apr 2018.

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

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

CORMIE, P. et al. Acute Inflammatory Response to Low-, Moderate-, and High-Load Resistance Exercise in Women With Breast Cancer-Related Lymphedema. **Integr Cancer Ther**, v. 15, n. 3, p. 308-17, Sep 2016.

CORPS, K. N. et al. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. **JAMA neurology**, v. 72, n. 3, p. 355-362, 2015.

CORRIGAN, F. et al. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2016.

COSTANTINI, T. W. et al. Targeting alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. **Am J Pathol**, v. 181, n. 2, p. 478-86, Aug 2012.

CRISCO, J. J. et al. Head impact exposure in collegiate football players. **Journal of biomechanics**, v. 44, n. 15, p. 2673-2678, 2011a.

CRISCO, J. J. et al. Head impact exposure in collegiate football players. **J Biomech**, v. 44, n. 15, p. 2673-8, Oct 13 2011b.

CRITCHLEY, M. Punch-drunk syndromes: the chronic traumatic encephalopathy of boxers. **Hommage a Clovis Vincent (ed) Maloine, Paris**, 1949.

CRITCHLEY, M. Medical aspects of boxing, particularly from a neurological standpoint. **British medical journal**, v. 1, n. 5015, p. 357, 1957.

DA LUZ SCHEFFER, D.; LATINI, A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, p. 165823, 2020a.

\_\_\_\_\_. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165823, 2020b.

DA SILVA FIORIN, F. et al. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: a behavioral and neurochemical approach. **Journal of neurotrauma**, v. 33, n. 14, p. 1317-1330, 2016a.

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 2016b.

DAGLAS, M. et al. Activated CD8+ T cells cause long-term neurological impairment after traumatic brain injury in mice. **Cell reports**, v. 29, n. 5, p. 1178-1191. e6, 2019.

DALTON, A. et al. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. **Gut Microbes**, v. 10, n. 5, p. 555-568, 2019a.

DALTON, A. et al. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. **Gut Microbes**, v. 10, n. 5, p. 555-568, 2019b.

DAS, M. et al. Lateral fluid percussion injury of the brain induces CCL20 inflammatory chemokine expression in rats. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 148, Oct 31 2011.

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. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 17, p. 6023-6044, 2017a.

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

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 2017c.

DE PORTO, A. P. et al. Assessment of splenic function. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, n. 12, p. 1465-73, Dec 2010.

DENAY, K. L. et al. ACSM call to action statement: COVID-19 considerations for sports and physical activity. **Current sports medicine reports**, v. 19, n. 8, p. 326-328, 2020.

DEWAN, M. C. et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, v. 130, n. 4, p. 1080-1097, 2018.

DI BATTISTA, A. P. et al. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury. **J Neuroinflammation**, v. 13, p. 40, Feb 16 2016.

DINET, V. et al. Brain-immune interactions and neuroinflammation after traumatic brain injury. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 1178, 2019.

EDWARDS, P. et al. CRASH trial collaborators. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. **Lancet**, v. 365, n. 9475, p. 1957-1959, 2005.

EK, M. et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. **J Neurosci**, v. 18, n. 22, p. 9471-9, Nov 15 1998.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

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.

ERNY, D.; PRINZ, M. Gut microbes augment neurodegeneration. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 304-305, 2017.

ERTÜRK, A. et al. Interfering with the chronic immune response rescues chronic degeneration after traumatic brain injury. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 38, p. 9962-9975, 2016.

FADEN, A. I. et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science**, v. 244, n. 4906, p. 798-800, 1989.

FARHAD, K. et al. Trends in outcomes and hospitalization costs for traumatic brain injury in adult patients in the United States. **J Neurotrauma**, v. 30, n. 2, p. 84-90, Jan 15 2013.

FARZI, A. et al. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 5-22, Jan 2018.

FENN, A. M. et al. Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: a role for primed microglia. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 7, p. 575-84, Oct 1 2014.

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.

FERNANDO FREIRE ROYES, L.; CASSOL, G. The effects of Creatine supplementation and physical exercise on traumatic brain injury. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 29-39, 2016.

FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 6-33, 2006.

FLEMINGER, S. et al. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 74, n. 7, p. 857-862, 2003.

FRANKIENSZTAJN, L. M. et al. The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, implications for anxiety and stress disorders. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 62, p. 76-82, Jun 2020.

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

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**, p. 39-71, 2014.

GARCIA, J. M. et al. Role of interleukin-10 in acute brain injuries. **Frontiers in neurology**, v. 8, p. 244, 2017.

GAVRILOVIĆ, L. et al. Forced exercise changes catecholamine synthesis in the spleen of adult rats. **Journal of neuroimmunology**, v. 251, n. 1-2, p. 1-5, 2012.

GENTILE, L. F. et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 72, n. 6, p. 1491, 2012.

GHIA, J. E. et al. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1122-1130, 2006.

GIELLEN, S. et al. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 12, n. 4, p. 393-400, Aug 2005.

GIUNTA, B. et al. The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2012.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 2, p. 693-699, 2007.

GODINHO, D. B. et al. The immunological influence of physical exercise on TBI-induced pathophysiology: crosstalk between the spleen, gut, and brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2021.

GOLDMAN, S. M. et al. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. **Annals of neurology**, v. 60, n. 1, p. 65-72, 2006.

GRAFF, R. M. et al. beta2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8+ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. **Brain Behav Immun**, v. 74, p. 143-153, Nov 2018.

GREEN, D. R. et al. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1109-1112, 2011.

GREGORY, T.; SMITH, M. Cardiovascular complications of brain injury. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 12, n. 2, p. 67-71, 2012.

GRIESBACH, G. S. Exercise after traumatic brain injury: is it a double-edged sword? **PM&R**, v. 3, n. 6, p. S64-S72, 2011a.

\_\_\_\_\_. Exercise after traumatic brain injury: Is it a double-edged sword? **PM&R**, v. 3, p. S64-S72, 2011b.

GRONLUND, M. M. et al. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 28, n. 1, p. 19-25, Jan 1999.

GUBERT, C. et al. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. **Neurobiology of disease**, v. 134, p. 104621, 2020.

GURKOFF, G. G. et al. Acute neuroprotection to pilocarpine-induced seizures is not sustained after traumatic brain injury in the developing rat. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 862-76, Dec 1 2009.

GYURASZOVA, M. et al. Association between oxidative status and the composition of intestinal microbiota along the gastrointestinal tract. **Medical hypotheses**, v. 103, p. 81-85, 2017.

HAIDER, M. N. et al. Exercise for sport-related concussion and persistent postconcussive symptoms. **Sports health**, v. 13, n. 2, p. 154-160, 2021.

HALL, S. et al. The role of vagus nerve overactivity in the increased incidence of pneumonia following traumatic brain injury. **British journal of Neurosurgery**, v. 28, n. 2, p. 181-186, 2014.

HANG, C.-H. et al. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 9, n. 12, p. 2776, 2003a.

HANG, C. H. et al. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 12, p. 2776-81, Dec 2003b.

HANSCOM, M. et al. Acute colitis during chronic experimental traumatic brain injury in mice induces dysautonomia and persistent extraintestinal, systemic, and CNS inflammation with exacerbated neurological deficits. **J Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 24, Jan 18 2021a.

HANSCOM, M. et al. Brain-gut axis dysfunction in the pathogenesis of traumatic brain injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 12, p. e143777, 2021b.

HARRISON-FELIX, C. L. et al. Mortality over four decades after traumatic brain injury rehabilitation: a retrospective cohort study. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 90, n. 9, p. 1506-13, Sep 2009.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-49, Nov 6 2014.

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.

HENSLER, T. et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 52, n. 5, p. 962-970, 2002.

HENSLER, T. et al. The effect of additional brain injury on systemic interleukin (IL)-10 and IL-13 levels in trauma patients. **Inflammation Research**, v. 49, n. 10, p. 524-528, 2000.

HILLION, J. et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18091-18097, 2002.

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

HOLSINGER, T. et al. Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. **Archives of general psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 17-22, 2002.

HOULDEN, A. et al. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 57, p. 10-20, 2016a.

HOULDEN, A. et al. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. **Brain Behav Immun**, v. 57, p. 10-20, Oct 2016b.

HUANG, X. et al. CD 4+ T cells in the pathobiology of neurodegenerative disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v. 211, n. 1-2, p. 3-15, 2009.

HUBER-LANG, M. et al. Innate immune responses to trauma. **Nature Immunology**, v. 19, n. 4, p. 327-341, 2018.

HUSTON, J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p. 1623-8, Jul 10 2006.

ITOH, T. et al. Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 2, p. 193-202, 2011.

JACOTTE-SIMANCAS, A. et al. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 10, p. 739-751, 2015.

JIA, K. et al. Effects of sequential nutritional support on nutritional status and expression of regulatory T lymphocyte in patients with early severe traumatic brain injury. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 14, p. 1561-1567, 2018.

JIANG, H. K. et al. Aerobic interval training protects against myocardial infarction-induced oxidative injury by enhancing antioxidant system and mitochondrial biosynthesis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 3, p. 192-201, 2014.



JIN, W. et al. Effects of tert-butylhydroquinone on intestinal inflammatory response and apoptosis following traumatic brain injury in mice. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 502564, 2010.

JIN, W. et al. Increased intestinal inflammatory response and gut barrier dysfunction in Nrf2-deficient mice after traumatic brain injury. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 135-40, Oct 2008.

JIN, W. et al. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against traumatic brain injury-induced acute intestinal mucosal injury in mice. **J Surg Res**, v. 157, n. 2, p. 251-60, Dec 2009.

JOO, J. et al. The influence of 15-week exercise training on dietary patterns among young adults. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 9, p. 1681-1690, 2019.

JUENGST, S. B. et al. Acute inflammatory biomarker profiles predict depression risk following moderate to severe traumatic brain injury. **The Journal of head trauma rehabilitation**, v. 30, n. 3, p. 207-218, 2015.

KAGNOFF, M. et al. Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. **Gut**, v. 28, n. 8, p. 995-1001, 1987.

KAKANIS, M. et al. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 13, p. e85-e86, 2010.

KANG, S. S. et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. **Molecular neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.

KAPPEL, M. et al. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. **J Appl Physiol (1985)**, v. 70, n. 6, p. 2530-4, Jun 1991.

KARLIN, A. M. Concussion in the pediatric and adolescent population: "different population, different concerns". **PM & R**, v. 3, n. 10, p. S369-S379, 2011.

KATZENBERGER, R. J. et al. The gut reaction to traumatic brain injury. **Fly (Austin)**, v. 9, n. 2, p. 68-74, 2015a.

KATZENBERGER, R. J. et al. The gut reaction to traumatic brain injury. **Fly**, v. 9, n. 2, p. 68-74, 2015b.

KAWAHARA, E. et al. Role of autonomic nervous dysfunction in electrocardio-graphic abnormalities and cardiac injury in patients with acute subarachnoid hemorrhage. **Circulation Journal**, v. 67, n. 9, p. 753-756, 2003.

KAWANISHI, S.; MURATA, M. Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. **Toxicology**, v. 221, n. 2-3, p. 172-8, Apr 17 2006.

KERR, N. A. et al. Traumatic brain injury-induced acute lung injury: evidence for activation and inhibition of a neural-respiratory-inflammasome axis. **Journal of Neurotrauma**, v. 35, n. 17, p. 2067-2076, 2018.

KHARATISHVILI, I.; PITKÄNEN, A. Posttraumatic epilepsy. **Current opinion in neurology**, v. 23, n. 2, p. 183-188, 2010.

KHARRAZIAN, D. Traumatic Brain Injury and the Effect on the Brain-Gut Axis. **Altern Ther Health Med**, v. 21 Suppl 3, p. 28-32, Aug 2015a.

KHARRAZIAN, D. Traumatic brain injury and the effect on the brain-gut axis. **Altern Ther Health Med**, v. 21, n. Suppl 3, p. 28-32, 2015b.

KHERA, T. K. et al. Tumour necrosis factor-mediated macrophage activation in the target organ is critical for clinical manifestation of uveitis. **Clin Exp Immunol**, v. 168, n. 2, p. 165-77, May 2012.

KIM, J. M. et al. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. **Nature Immunology**, v. 8, n. 2, p. 191-197, 2007.

KIMURA, H. et al. Neural anti-inflammatory action mediated by two types of acetylcholine receptors in the small intestine. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 5887, Apr 10 2019a.

KIMURA, K. et al. Nicotinic alpha-7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **J Diabetes Investig**, v. 10, n. 3, p. 659-666, May 2019b.

KLEIN, R. S. et al. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. **Nat Immunol**, v. 18, n. 2, p. 132-141, Feb 2017.

KOSARI-NASAB, M. et al. The blockade of corticotropin-releasing factor 1 receptor attenuates anxiety-related symptoms and hypothalamus-pituitary-adrenal axis reactivity in mice with mild traumatic brain injury. **Behav Pharmacol**, v. 30, n. 2 and 3-Spec Issue, p. 220-228, Apr 2019a.

KOSARI-NASAB, M. et al. Quercetin mitigates anxiety-like behavior and normalizes hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in a mouse model of mild traumatic brain injury. **Behav Pharmacol**, v. 30, n. 2 and 3-Spec Issue, p. 282-289, Apr 2019b.

KOTTKE, M. A.; WALTERS, T. J. Where's the leak in vascular barriers? A review. **Shock**, v. 46, n. 3S, p. 20-36, 2016.

KRAMER, T. J. et al. Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon-gamma gene expression in acute experimental traumatic brain injury. **J Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 163, Aug 5 2019.

KRÜGER, K. et al. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n. 3, p. 324-338, 2008.

KRUGER, K. et al. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 3, p. 324-38, Mar 2008.

KRUGER, K.; MOOREN, F. C. T cell homing and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 13, p. 37-54, 2007.

KUMAR, A. et al. Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 33, n. 19, p. 1732-1750, 2016.

KUMAR, R. G. et al. Temporal Acute Serum Estradiol and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Associations and Risk of Death after Severe Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 37, n. 20, p. 2198-2210, 2020.

KWAK, Y.-S. et al. The effect of different type of exercise on SOD, neutrophils and T lymphocytes. **Immune Network**, v. 5, n. 4, p. 232-236, 2005.

LANGLOIS, J. A. et al. Traumatic brain injury in the United States; emergency department visits, hospitalizations, and deaths. 2006.

LEE, K.; RINCON, F. Pulmonary complications in patients with severe brain injury. **Critical care research and practice**, v. 2012, 2012.

LEE, S. W. et al. Microglial inflammasome activation in penetrating ballistic-like brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 35, n. 14, p. 1681-1693, 2018.

LEWIS, S. M. et al. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science Immunology**, v. 4, n. 33, 2019.

LI, L. et al. An update on the association between traumatic brain injury and Alzheimer's disease: focus on tau pathology and synaptic dysfunction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2020a.

LI, M. et al. Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury. **Chin Med J (Engl)**, v. 128, n. 8, p. 1072-8, Apr 20 2015.

LI, M. et al. Epidemiology of traumatic brain injury over the world: a systematic review. **General medicine: open access**, v. 4, n. 5, p. e275-e275, 2016.

LI, Z. et al. Mind–body exercise for anxiety and depression in copd patients: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 1, p. 22, 2020b.

LIAO, P. et al. Repetitive bouts of exhaustive exercise induces a systemic inflammatory response and multi-organ damage in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 685, 2020.

LIESZ, A. et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 192-199, 2009.

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

LIMA, F. D. et al. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1279, p. 147-155, 2009b.

LINDSAY, A. et al. Changes in acute biochemical markers of inflammatory and structural stress in rugby union. **J Sports Sci**, v. 33, n. 9, p. 882-91, 2015.

LINKE, A. et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1763-1770, 2005.

LIU, M.-T. et al. 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 31, p. 9683-9699, 2009.

LIU, Y. et al. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. **Nature Medicine**, v. 12, n. 5, p. 518-525, 2006.

LIU, Y. et al. Gut microbiome fermentation determines the efficacy of exercise for diabetes prevention. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 77-91. e5, 2020.

LOANE, D. J.; KUMAR, A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 316-327, 2016.

LONGHI, L. et al. Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury. **Neurosurgery**, v. 56, n. 2, p. 364-74; discussion 364-74, Feb 2005.

MA, E. L. et al. Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 66, p. 56-69, 2017a.

MA, E. L. et al. Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. **Brain Behav Immun**, v. 66, p. 56-69, Nov 2017b.

MA, T. Y. et al. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 3, p. G422-30, Mar 2005.

MA, X. et al. Animal models of traumatic brain injury and assessment of injury severity. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 8, p. 5332-5345, 2019.

MAAS, A. I. et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 12, p. 987-1048, 2017.

MACH, N. et al. Understanding the Holobiont: Crosstalk Between Gut Microbiota and Mitochondria During Long Exercise in Horse. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 126, 2021.

MACIEJCZYK, M. et al. Salivary antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to proteins and lipids in healthy children, adults, and the elderly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

MACKINNON, L. T. et al. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 12, p. 1637-45, Dec 1997.

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

MALIN, S. K. et al. Effect of adiposity on insulin action after acute and chronic resistance exercise in non-diabetic women. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 12, p. 2933-41, Dec 2013.

MALLARD, A. R. et al. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 160, p. 471-479, Nov 20 2020.

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.

MARQUES-ALEIXO, I. et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 99, n. 2, p. 149-62, Nov 2012.

MARTELLI, D. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. **Auton Neurosci**, v. 182, p. 65-9, May 2014.

MARTIN-CORDERO, L. et al. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. **European Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 5, p. 535-543, 2009.

MARTLAND, H. S. Punch drunk. **Journal of the American Medical Association**, v. 91, n. 15, p. 1103-1107, 1928.

MASEL, B. E.; DEWITT, D. S. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 8, p. 1529-1540, 2010.

MATHARU et al. Repeated mild traumatic brain injury affects microbial diversity in rat jejunum. **Journal of Biosciences**, Sep 21 2019.

MATTEOLI, G. et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. **Gut**, v. 63, n. 6, p. 938-48, Jun 2014.

MAYER, E. A. et al. Gut/brain axis and the microbiota. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 926-38, Mar 2 2015.

MCCRORY, P. Revisiting the AAN guidelines on sport-related concussion. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 7, p. 361-362, 2013.

MCCRORY, P. et al. Consensus statement on concussion in sport—the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. **PM & R**, v. 5, n. 4, p. 255-279, 2013.

MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. Exercise adaptations: molecular mechanisms and potential targets for therapeutic benefit. **Nat Rev Endocrinol**, v. 16, n. 9, p. 495-505, Sep 2020.

MCHUGH, G. S. et al. Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. **J Neurotrauma**, v. 24, n. 2, p. 287-93, Feb 2007.

MCKEE, C. A.; LUKENS, J. R. Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 556, 2016.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 91, n. 11, p. 1637-1640, 2010a.

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

MICHELI, L. et al. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. **Brain Res Bull**, v. 143, p. 181-193, Oct 2018.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 7, p. 1126-67, Mar 1 2014.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 240-264, 2006.

MORRIS, N. A. et al. Subarachnoid Hemorrhage and Long-Term Stroke Risk After Traumatic Brain Injury. **Neurohospitalist**, v. 7, n. 3, p. 122-126, Jul 2017.

MOTA, B. C. et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. **Neurotoxicity Research**, v. 21, n. 2, p. 175-184, 2012.

MUELLER, S. N.; GERMAIN, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 9, p. 618-629, 2009.

MUNCE, T. A. et al. Head Impact Exposure and Neurologic Function of Youth Football Players. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 47, n. 8, p. 1567-1576, 2015.

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

NAKAI, A. et al. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta$ 2-adrenergic receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 13, p. 2583-2598, 2014.

NAKAYAMADA, S. et al. Helper T cell diversity and plasticity. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 3, p. 297-302, 2012.

NANNO, M. et al. Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 481-90, Feb 2008.

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.

NOBLE, B. T. et al. The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury. **J Neuroimmunol**, v. 321, p. 1-11, Aug 15 2018a.

NOBLE, B. T. et al. The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury. **Journal of Neuroimmunology**, v. 321, p. 1-11, 2018b.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

OMALU, B. I. et al. Chronic traumatic encephalopathy, suicides and parasuicides in professional American athletes: the role of the forensic pathologist. **The American journal of forensic medicine and pathology**, v. 31, n. 2, p. 130-132, 2010.

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.

OUELLET, M.-C. et al. Correlates of cognitive functioning in independent elderly patients discharged home from the emergency department after a minor injury. **International Psychogeriatrics**, v. 28, n. 8, p. 1313, 2016.

PEAKE, J. M. et al. Recovery of the immune system after exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 122, n. 5, p. 1077-1087, May 1 2017.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012.

PEDERSEN, B. K.; STEENBERG, A. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6—shared mechanisms? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 12, p. 2004-2012, 2002.

PENGAM, M. et al. Training protocols differently affect AMPK-PGC-1alpha signaling pathway and redox state in trout muscle. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 243, p. 110673, May 2020.



PERRY, S. A. et al. The effectiveness of physical exercise as an intervention to reduce depressive symptoms following traumatic brain injury: A meta-analysis and systematic review. **Neuropsychological Rehabilitation**, v. 30, n. 3, p. 564-578, 2020.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005.

PFISTER, T. et al. The incidence of concussion in youth sports: a systematic review and meta-analysis. **British journal of sports medicine**, v. 50, n. 5, p. 292-297, 2016.

Physical activity guidelines for Americans. **Okla Nurse**, v. 53, n. 4, p. 25, Dec-2009 Feb 2008.

PIAO, C. S. et al. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. **Neurobiol Dis**, v. 54, p. 252-63, Jun 2013.

PILLON BARCELOS, R. et al. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. **Free radical research**, v. 51, n. 2, p. 222-236, 2017.

PLESNILA, N. The immune system in traumatic brain injury. **Current opinion in pharmacology**, v. 26, p. 110-117, 2016.

POWELL, N. et al. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 3, p. 143-159, Mar 2017a.

POWELL, N. et al. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 3, p. 143-159, 2017b.

PROSCHINGER, S.; FREESE, J. Neuroimmunological and neuroenergetic aspects in exercise-induced fatigue. **Exercise immunology review**, v. 25, 2019.

RADAK, Z. et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 187-196, 2016.

RADAK, Z. et al. Exercise effects on physiological function during aging. **Free Radic Biol Med**, v. 132, p. 33-41, Feb 20 2019.

RAMANAN, D.; CADWELL, K. Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 4, p. 434-441, 2016.

RAMBO, L. M. et al. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylenetetrazol-induced seizures. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 857-68, Mar 2013.

RAO, M. C. Physiology of electrolyte transport in the gut: implications for disease. **Comprehensive Physiology**, v. 9, n. 3, p. 947-1023, 2011.

RASOULI, J. et al. Brain-spleen inflammatory coupling: a literature review. **The Einstein journal of biology and medicine: EJBM**, v. 27, n. 2, p. 74, 2011.

RAVENEY, B. J. et al. TNFR1 signalling is a critical checkpoint for developing macrophages that control of T-cell proliferation. **Immunology**, v. 131, n. 3, p. 340-9, Nov 2010.

REN, D. et al. Overexpression of Astrocytes-Specific GJA1-20k Enhances the Viability and Recovery of the Neurons in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 1643-1650, 2020.

RHEE, S. H. et al. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 5, p. 306, 2009.

ROBERTS, I. et al. CRASH trial collaborators. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1321-1328, 2004.

ROBERTSON, C. L. et al. Mitochondrial dysfunction early after traumatic brain injury in immature rats. **J Neurochem**, v. 101, n. 5, p. 1248-57, Jun 2007.

ROCA, E. et al. Effects of a polysaccharide-based multi-ingredient supplement on salivary immunity in non-elite marathon runners. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2019.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 11008-13, Aug 5 2008.

ROYES, L. F. F. Cross-talk between gut and brain elicited by physical exercise. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165877, 2020a.

\_\_\_\_\_. Cross-talk between gut and brain elicited by physical exercise. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, p. 165877, 2020b.

ROYES, L.; CASSOL, G. The effects of Creatine supplementation and physical exercise on traumatic brain injury. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 29-39, 2016.

ROYES, L. F. F.; GOMEZ-PINILLA, F. Making sense of gut feelings in the traumatic brain injury pathogenesis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 345-361, 2019.

RUSSO, M. V.; MCGAVERN, D. B. Distinct Myeloid Cell Subsets Promote Angiogenesis and Damaged Tissue Clearance Following Mild Traumatic Brain Injury: *Am Assoc Immunol* 2017.

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

SAMPSON, T. R.; MAZMANIAN, S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. **Cell Host Microbe**, v. 17, n. 5, p. 565-76, May 13 2015.

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.

SCHEFFER, D. D. L. et al. Moderate running exercise prevents excessive immune system activation. **Physiol Behav**, v. 204, p. 248-255, May 15 2019.

SCHEFFER, D. D. L.; LATINI, A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1866, n. 10, p. 165823, Oct 1 2020.

SCHEIMAN, J. et al. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. **Nat Med**, v. 25, n. 7, p. 1104-1109, Jul 2019.

SCHIWECK, J. et al. Drebrin mediates scar formation and astrocyte reactivity during brain injury by inducing RAB8 tubular endosomes. **BioRxiv**, 2020.

SCHNEIDER, H. J. et al. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. **Jama**, v. 298, n. 12, p. 1429-1438, 2007.

SCHWULST, S. J. et al. Traumatic brain injury-induced alterations in peripheral immunity. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 75, n. 5, p. 780, 2013.

SEN, T. et al. Aberrant ER Stress Induced Neuronal-IFNbeta Elicits White Matter Injury Due to Microglial Activation and T-Cell Infiltration after TBI. **J Neurosci**, v. 40, n. 2, p. 424-446, Jan 8 2020.

SENDER, R. et al. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol**, v. 14, n. 8, p. e1002533, Aug 2016.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SHARKEY, J. et al. A noninvasive imaging toolbox indicates limited therapeutic potential of conditionally activated macrophages in a mouse model of multiple organ dysfunction. **Stem cells international**, v. 2019, 2019.

SHEPHARD, R. J. Exercise proteinuria and hematuria: current knowledge and future directions. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 56, n. 9, p. 1060-1076, 2015.

SHIMOJO, G. et al. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 75, p. 181-191, 2019.

SHOHAMI, E. et al. Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile. **Journal of Neurotrauma**, v. 16, n. 5, p. 365-376, 1999.

SIGNORETTI, S. et al. The pathophysiology of concussion. **PM R**, v. 3, n. 10 Suppl 2, p. S359-68, Oct 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 2013a.

SILVA, L. F. A. et al. Treadmill exercise protects against pentylentetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 14, p. 1278-1287, 2013b.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the Regulation of Immune Functions. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 355-80, 2015.

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

SPIELMAN, L. J. et al. Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, 2018.

STAKENBORG, N. et al. Preoperative administration of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist prucalopride reduces intestinal inflammation and shortens postoperative ileus via cholinergic enteric neurons. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1406-1416, 2019.

STEWART, L. K. et al. Influence of exercise training and age on CD14<sup>+</sup> cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 389-397, 2005a.

STEWART, L. K. et al. Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 5, p. 389-97, Sep 2005b.

STOECKLEIN, V. M. et al. Trauma equals danger--damage control by the immune system. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 3, p. 539-51, Sep 2012.

STOJILJKOVIC, V. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. **Clin Biochem**, v. 42, n. 13-14, p. 1431-7, Sep 2009.

STOJILJKOVIĆ, V. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13-14, p. 1431-1437, 2009.

STRAUB, R. H. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 2, p. 1-15, 2014.

SUN, B. et al. The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal smooth muscle contraction through PKC/MLCK/MLC signaling pathway in TBI mouse model. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128214, 2015.

SUNDMAN, M. H. et al. The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 66, p. 31-44, 2017a.

SUNDMAN, M. H. et al. The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease. **Brain Behav Immun**, v. 66, p. 31-44, Nov 2017b.

SVENSSON, M. et al. Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 29, n. 6, p. 577-589, 2015.

SWIRSKI, F. K. et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 612-616, 2009.

TABOR, J. et al. Neuroendocrine Whiplash: Slamming the Breaks on Anabolic-Androgenic Steroids Following Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in Rats May Worsen Outcomes. **Front Neurol**, v. 10, p. 481, 2019.

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.

TANSEY, E. Pavlov at home and abroad: His role in international physiology. **Autonomic Neuroscience**, v. 125, n. 1-2, p. 1-11, 2006.

TAPP, Z. M. et al. A tilted axis: maladaptive inflammation and HPA axis dysfunction contribute to consequences of TBI. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 345, 2019.

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.

THE, F. et al. Central activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces surgical inflammation in experimental post-operative ileus. **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 5, p. 1007-16, Jul 2011.

THEADOM, A. et al. Population-based cohort study of the impacts of mild traumatic brain injury in adults four years post-injury. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191655, 2018.

TIESI, G. et al. Early trauma-hemorrhage-induced splenic and thymic apoptosis is gut-mediated and toll-like receptor 4-dependent. **Shock**, v. 39, n. 6, p. 507-13, Jun 2013a.

TIESI, G. et al. Early trauma hemorrhage-induced splenic and thymic apoptosis is gut-mediated and TLR4-dependent. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 39, n. 6, p. 507, 2013b.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TSUCHIDA, Y. et al. Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via alpha7nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 638-47, May 2011.

TURNBAUGH, P. J. et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 6ra14-6ra14, 2009.

UHLICH, R. et al. Splenectomy does not affect the development of pneumonia following severe traumatic brain injury. **Brain, Behavior, & Immunity-Health**, v. 1, p. 100007, 2020.

ULGES, A. et al. Context-and tissue-specific regulation of immunity and tolerance by regulatory T cells. In: (Ed.). **Advances in Immunology**: Elsevier, v.132, 2016. p.1-46. ISBN 0065-2776.

UMPHRED, D. A. **Fisioterapia Neurológica**. Manole, 1994. ISBN 8520400485.

URBAN, R. J. et al. Altered Fecal Microbiome Years after Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**, v. 37, n. 8, p. 1037-1051, Apr 15 2020.

VAGNOZZI, R. et al. Hypothesis of the postconcussive vulnerable brain: experimental evidence of its metabolic occurrence. **Neurosurgery**, v. 57, n. 1, p. 164-71; discussion 164-71, Jul 2005.

VAGNOZZI, R. et al. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: mitochondrial-related impairment--part I. **Neurosurgery**, v. 61, n. 2, p. 379-88; discussion 388-9, Aug 2007.

VAN WIJCK, K. et al. Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, n. 2, p. G155-68, Jul 15 2012.

VANDERBEKEN, I.; KERCKHOFS, E. A systematic review of the effect of physical exercise on cognition in stroke and traumatic brain injury patients. **Neuro Rehabilitation**, v. 40, n. 1, p. 33-48, 2017.

VERWEIJ, B. H. et al. Mitochondrial dysfunction after experimental and human brain injury and its possible reversal with a selective N-type calcium channel antagonist (SNX-111). **Neurol Res**, v. 19, n. 3, p. 334-9, Jun 1997.

VILLAPOL, S. Consequences of hepatic damage after traumatic brain injury: current outlook and potential therapeutic targets. **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 2, p. 226, 2016.

VILLAPOL, S. et al. Hepatic expression of serum amyloid A1 is induced by traumatic brain injury and modulated by telmisartan. **Am J Pathol**, v. 185, n. 10, p. 2641-52, Oct 2015a.

VILLAPOL, S. et al. Hepatic expression of serum amyloid A1 is induced by traumatic brain injury and modulated by telmisartan. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2641-2652, 2015b.

WAGNER, A.; KUMAR, R. TBI rehabiliomics research: conceptualizing a humoral triad for designing effective rehabilitation interventions. **Neuropharmacology**, v. 145, p. 133-144, 2019.

WALKER, P. A. et al. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes. **Experimental neurology**, v. 225, n. 2, p. 341-352, 2010.

WALSH, N. P. et al. Position statement part one: immune function and exercise. 2011.

WALSH, N. P.; OLIVER, S. J. Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. **Immunology and cell biology**, v. 94, n. 2, p. 132-139, 2016.

WANG, C.-F. et al. Depletion of microglia attenuates dendritic spine loss and neuronal apoptosis in the acute stage of moderate traumatic brain injury in mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 37, n. 1, p. 43-54, 2020.

WANG, M. et al. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 2, p. 219-231, 2005.

WASHINGTON, P. M. et al. Polypathology and dementia after brain trauma: Does brain injury trigger distinct neurodegenerative diseases, or should they be classified together as traumatic encephalopathy? **Exp Neurol**, v. 275 Pt 3, p. 381-388, Jan 2016.

WAZEA, S. A. et al. Galantamine anti-colitic effect: Role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in modulating Jak/STAT3, NF-kappaB/HMGB1/RAGE and p-AKT/Bcl-2 pathways. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5110, Mar 23 2018.

WEI, L. et al. Sleep disturbances following traumatic brain injury in older adults: a comparison study. **The Journal of Head Trauma Rehabilitation**, v. 35, n. 4, p. 288-295, 2020.

WILLEMZE, R. A. et al. Neural reflex pathways in intestinal inflammation: hypotheses to viable therapy. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 6, p. 353-62, Jun 2015.

WILSON, L. et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 10, p. 813-825, 2017.

XIONG, Y. et al. Animal models of traumatic brain injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 128-142, 2013.

XU, X. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2017.

YOO, B. B.; MAZMANIAN, S. K. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 910-926, 2017.



ZHANG, F. et al. Longitudinal dynamics of gut bacteriome, mycobiome and virome after fecal microbiota transplantation in graft-versus-host disease. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2021.

ZHANG, X.; JIANG, X. Effects of enteral nutrition on the barrier function of the intestinal mucosa and dopamine receptor expression in rats with traumatic brain injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, n. 1, p. 114-123, 2015a.

ZHANG, X.; JIANG, X. Effects of enteral nutrition on the barrier function of the intestinal mucosa and dopamine receptor expression in rats with traumatic brain injury. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 39, n. 1, p. 114-23, Jan 2015b.

ZHENG, G. et al. Aerobic exercises for cognition rehabilitation following stroke: a systematic review. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2780-2789, 2016.



## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



*Comissão de Ética no Uso de Animais*

da  
*Universidade Federal de Santa Maria*

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES ASSOCIADAS À PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO NO EIXO DE COMUNICAÇÃO BIDIRECIONAL ENTRE CÉREBRO E INTESTINO DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 9334091219 (ID 002967), sob a responsabilidade de **Luiz Fernando Freire Royes e equipe; Douglas Buchmann Godinho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 28/04/2020.

We certify that the proposal "EFFECT OF RECURRENT CONCUSSIONS ASSOCIATED WITH PRACTICE OF PHYSICAL EXERCISE IN THE BIDIRECTIONAL COMMUNICATION AXLE BETWEEN BRAIN AND INTESTINE OF RATS", utilizing 112 Heterogenics rats (112 males), protocol number CEUA 9334091219 (ID 002967), under the responsibility of **Luiz Fernando Freire Royes and team; Douglas Buchmann Godinho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 04/28/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2020](#) a [02/2021](#)

Área: [Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFMS](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [30 a 30 dias](#)

N: [112](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [60 a 80 g](#)

Local do experimento: [Laboratório de Bioquímica do Exercício, CEFD, Predio 51.](#)

Santa Maria, 28 de setembro de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria