



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

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE O  
DEFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELO TRAUMATISMO  
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS JOVENS.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Guilherme Lago Busanello**

**Santa Maria – RS, Brasil  
2015**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE O  
DEFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELO TRAUMATISMO  
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS JOVENS.**

**Guilherme Lago Busanello**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Mestre em Educação Física**.

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

Santa Maria-RS, Brasil  
2015

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

**A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de Mestrado.**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE O  
DEFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELO TRAUMATISMO  
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS JOVENS.**

Elaborada por  
**Guilherme Lago Busanello**

Como requisito para a obtenção do grau de  
**Mestre em Educação Física**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Luiz Fernando Freire Royes**  
(Presidente/Orientador)

---

Mauren Assis de Souza (UNIPAMPA)

---

Guilherme Bermaschi Bresciani (UAC)

Santa Maria-RS, 03 de Julho de 2015.

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, meus irmãos e minha namorada que me apoiaram incondicionalmente em todas minhas conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, seu Enivaldo Busanello e dona Nilza Lago aos quais devo tudo que sou. Por tudo que sempre fizeram e fazem por mim, e não apenas por mim e sim pelos seus três filhos, abdicando de muita coisa a vida toda, para poder ver seus filhos bem e confortáveis. Chama a atenção que um homem de pouco estudo do interior de Pinhal Grande e uma mulher com magistério da mesma localidade, constituíram família em São Luiz Gonzaga e por mais difícil que situação estivesse nunca deixam de insistir em formar seus três filhos, “não basta apenas segundo grau” ambos diziam por mais que relutasse dizendo que o ensino superior não lhe faria falta, agradeço muito por terem insistido e mostrado o caminho, pois hoje este exemplo de pai e mãe o qual quero ser para meus filhos formaram uma bióloga, um educador físico e estão formando em setembro um engenheiro agrônomo. Muito Obrigado meus queridos por serem esse exemplo de pessoa, dignidade e honestidade. Sempre amarei vocês.

Agradeço também aos meus irmãos Daniela e Rafael Busanello pelo suporte e apoio incondicional dos dois, pela prontidão e disposição sempre que foi precisado.

Flávia Leitão, minha namorada, presente que Santa Maria me deu, mulher companheira, que sempre me apoiou e incentivou nos momentos mais difíceis, exemplo de persistência e dedicação a qual acompanharei por toda minha vida. Te Amo muito.

Família Leitão, em especial a Cláudia, por ter me acolhido e me recebido como filho em sua casa, meu muito obrigado é pouco para agradecer por tudo que faz por mim. Amo-os como minha segunda família.

Agradecer ao Dr. Frederico Diniz Lima, por ter me incentivado e me tirado da zona de conforto a qual eu me encontrava em 2012. Por mais que tenha me mentido com relação à “barbada que seria fazer este mestrado” devo a ti meu guri esta oportunidade, obrigado por me mostrar um mundo que existe fora de São Luiz.

Ao meu orientador Professor Dr. Luiz Fernando Freire Royes, muito obrigado por ter acreditado em mim, me incentivado, orientado e por ser este amigo que levarei no coração. Muito Obrigado “nandico”.

Como agradecer a FAMÍLIA BIOEX, devo muito a vocês, levo todos no coração, cada um participou e contribuiu muito na minha formação. Muito obrigado Lelê, Rô, Fred, Maurão, Xará, Fernandinha, Mauren, Bibis, Mauricio, Léo, Mandolante, Gustavo, Vivi, Ana Leticia e as paquitas Marla, Tiopental e Ale, muito obrigado por tudo;

Maurinho e Fio terra muito obrigado pelas gavagens e apoio nas cirurgias;

As alemoa do 21, Ana e Thaíze muito obrigado pelo apoio incansável no western blot, também ao professor Dr. Mauro muito obrigado pelo apoio.

Em especial ao Iuri, Samurai e Aninha, não tenho palavras para descrever o quando vocês são importantes, aninha muito obrigado pelo incentivo e inúmeros ensinamentos e a vocês dois seus P.... são irmão de fé que levarei pra vida toda, não contribuíram apenas cientificamente nesta caminhada, fizeram parte da minha vida por isso amo-os seus lindos.

Agradeço também aos órgãos de fomento Capes e CNPq por tornar este sonho realidade.

**MUITO OBRIGADO A TODOS, SEM VOCÊS JAMAIS CONSEGUIRIA  
MUITO OBRIGADO !!!**

“Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário”.

**Steve Jobs**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Educação Física  
Universidade Federal de Santa Maria

### **O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE O DEFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS JOVENS.**

AUTOR: Guilherme Lago Busanello

ORIENTADOR: Luiz Fernando Freire Royes

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de julho de 2015.

Por definição o Traumatismo Cranioencefálico (TCE) é um acometimento comum em todas as sociedades e abrange todo o conjunto de processos que sozinhos ou em combinação podem danificar o encéfalo. Em crianças e adolescentes o TCE representa uma interrupção em seu desenvolvimento normal, com estimativas que variam de 200 a 500 casos para cada 100.000 ao ano. A maioria dos casos é caracterizada como leve, com poucas consequências a longo prazo, entretanto, uma porção significativa de jovens sofrerá ferimentos mais graves. Além disso, o TCE juvenil é a principal causa de morte e incapacidade em crianças e adolescente. Neste sentido, chama-se a atenção traumas sofridos, principalmente por jovens durante pratica de esportes de contato como as artes marciais, o futebol americano, hóquei no gelo, baseball. Devido a grande variedade de condições associadas ao TCE, há um considerável interesse no desenvolvimento e posterior aplicação de marcadores bioquímicos que relacionem a gravidade do dano cerebral com o desenvolvimento de problemas neurológicos, como déficits de memória e aprendizado. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, verificar se o se os animais jovens submetidos ao TCE apresentavam déficit cognitivo quinze dias após a lesão e se a suplementação com creatina possui efeito protetor, alterando a atividade da enzima CK, modulando a expressão das proteínas AMPK, CREB, p-CREB e BDNF envolvidas no déficit cognitivo e no dano histológico gerado pelo TCE. Para tal o presente estudo utilizou ratos Wistar jovens machos aos 35 dia de vida submetidos ao TCE ou submetido a todos os processos exceto o TCE, foram divididos em quatro grupos onde foram aleatoriamente separados, para receber a suplementação com Cr (300 mg / kg, p.o), suspensa em CMC a 0,5% ou veículo (CMC) duas vezes ao dia por um período de 14 dias. Foi evidenciado que os animais submetidos ao TCE apresentaram uma redução nas funções cognitivas avaliadas pela tarefa de reconhecimento de objeto 15 dias após o TCE. Já os animais que receberam a suplementação com creatina não tiveram suas funções comprometidas. Nossos dados bioquímicos revelaram que a atividade da enzima creatina quinase estava aumentada quinze dias pós-trauma, no mesmo período o TCE não alterou a expressão de AMPK porem a suplementação com creatina aumentou sua expressão, sugerindo uma conexão entre CK e AMPK após o TCE, uma vez que a suplementação com creatina foi efetiva em elevar a atividade da CK ao mesmo tempo que elevou a expressão de AMPK, também causou um aumento significativo na razão entre CREB e p-CREB nos animais que foram suplementados. Observamos também a participação do BDNF, cuja expressão esta aumenta nos animais que foram submetidos ao TCE e foram suplementados com creatina, na proteção evidenciada pela creatina no volume da lesão induzida pelo TCE.

Palavras-chave: Traumatismo Cranioencefálico por Percussão de Fluido; Ratos jovens; Memória de Reconhecimento; Déficit Cognitivo; Suplementação com Creatina..



## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduate Program in Physical Education  
Federal University of Santa Maria

### **THE EFFECT OF CREATINE SUPPLEMENTATION ON COGNITIVE DEFICIT INDUCED BY TRAUMATIC BRAIN INJURY IN JUVENILE RATS.**

AUTHOR: Guilherme Lago Busanello  
ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes  
Date and Place: Santa Maria, July 03, 2015.

By definition Traumatic brain injury (TBI) is a common involvement in all societies and covers the entire set of processes that alone or in combination can damage the brain. In children and adolescents TBI is an interruption in their normal development, with estimates ranging from 200 to 500 cases per 100,000 per year. Most cases are characterized as mild, with few long-term consequences, however, a significant portion of young people suffer more serious injuries. Furthermore, Juvenile TBI is the major cause of death and disability in children and adolescents. An important factor is that the sports and youth have always been closely related. In this sense, it called attention traumas, especially for young people during practice of contact sports such as martial arts, football, ice hockey, baseball. Because of the wide variety of conditions associated with TBI, there is considerable interest in the development and subsequent application of biochemical markers that relate the severity of brain damage with the development of neurological problems such as memory and learning deficits. In this context, this study aimed, at first, to see if the young animals subjected to TBI had cognitive impairment fifteen days after the injury and whether creatine supplementation has protective effect by changing the activity of CK enzyme, modulating the expression of AMPK protein, CREB, p-CREB and BDNF involved in cognitive impairment and histological damage generated by TBI To this end the present study used young male Wistar rats at 35 days of life subjected to TBI or subjected to all processes except TBI were divided into four groups which were randomized to receive the Cr supplementation (300 mg / kg po) was suspended in 0.5% CMC or vehicle (CMC) twice daily for a period of 14 days. it was shown that animals on submitted to TBI showed a reduction in cognitive functions evaluated by 15 days object recognition task after TBI. The animals that received creatine supplementation did not have their compromised functions. Our biochemical data revealed that the activity of the enzyme creatine kinase was increased fifteen days after trauma, in the same period the TBI did not alter the expression of AMPK however creatine supplementation increased its expression, suggesting a connection between CK and AMPK after TBI, since the creatine supplementation was effective in raising the activity of CK while increased expression of AMPK also caused a significant increase in the ratio of CREB and p-CREB in animals that were supplemented. We also note the participation of BDNF, whose expression this increases the animals submitted to the TBI and were supplemented with creatine, protection evidenced by creatine in lesion volume induced by the TBI.

Keywords: Traumatic brain injury for Percussion Fluid (FPI); juvenile rats;  
Recognition memory; Cognitive deficit; Creatine supplementation

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Escala de coma de Glaslow .....	17
Tabela 2	Concentração de creatina em alimentos .....	32
Tabela 3	Anticorpos primários .....	49
Tabela 4	Anticorpos Secundários .....	49

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Tipos de causas de TCE .....	18
Figura 2	Fisiopatologia do TCE .....	22
Figura 3	Estrutura química das moléculas de creatina, fosfocreatina e creatinina .....	31
Figura 4	Esquema representativo da ação da enzima creatina quinase .....	32
Figura 5	Esquema representativo da ação da enzima creatina quinase .....	32
Figura 6	Síntese de creatina em mamíferos .....	33
Figura 7	Modelo de síntese e transporte de creatina no SNC .....	35
Figura 8	Modelo de transporte de creatina e guanidinoacetato através da BHE e do fluido cérebro-espinhal .....	36
Figura 9	Acoplamento da síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons e o sistema creatina quinase / fosfocreatina .....	38
Figura 10	Sistema creatina quinase/fosfocreatina .....	38
Figura 11	Desenho experimental .....	45
Figura 12	Indução do TCE e localização craniectomia .....	46
Figura 13	Arena Reconhecimento de Objeto .....	47
Figura 14	Efeito da suplementação com creatina sobre o déficit cognitivo....	52
Figura 15	Efeito da suplementação com creatina sobre a atividade da enzima CK .....	53
Figura 16	Efeito da suplementação com creatina na expressão de AMPK ...	54
Figura 17	Efeito da suplementação com creatina na expressão de CREB e p-CREB .....	55
Figura 18	Efeito da suplementação com creatina na expressão de BDNF ....	56
Figura 19	Efeito da suplementação com creatina sobre o Volume de Lesão	56
Figura 20	Demonstrativo Volume de Lesão .....	57

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACC-2	Acetil CoA carboxilase - 2
ADP	Adenosina difosfato
AGAT	L-arginina glicina amidinotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	fator neurotrófico derivado do encefalo
BHE	Barreira hematoencefalica
Ca <sup>2+</sup>	Íon Cálcio
CAMK-II	Quinase dependente de Cálcio/Calmodulina
CCI	Lesão por impacto cortical controlado
CK	Enzima Creatina quinase
CMC	Carboximetil celulose
CMRglc	Taxa metabólica de glicose
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico
ECG	Escala de coma de Glasgow
EUA	Estados Unidos da América
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GAA	Guanidinoacetato
GAMT	Guanidinoacetato metiltransferase
Glut 1	Transportador de glicose
Glut 3	Transportador de glicose
Glut 4	Transportador de glicose
LKB-1	Fígado quinase B-1
LPF	Lesão por percussão de fluido
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Quinase ativada por mitógenos
MCT	Transportador de monocarboxilatos
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NGF	Fator de crescimento do nervo

NMDA	N-metil-D-aspartato
PGC-1 $\alpha$	coativador do receptor ativado pelo proliferador peroxissomal $\lambda$ - 1 $\alpha$
Pi3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PIC	Pressão intracraniana
PKA	Proteína quinase dependente de AMP cíclico
PPC	Pressão de perfusão cerebral
p.o.	Por via oral
SLC6A8	Transportador de creatina
SNC	Sistema nervoso central
TCE	Traumatismo cranioencefálico
$\beta$ OHB	Beta-Hidroxibutirato

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. MEMÓRIA</b> .....	<b>25</b>
2.1 Tipos de memória .....	25
<b>3. CREATINA</b> .....	<b>32</b>
3.1. Creatina quinase/fosfocreatina .....	37
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
4.1 Objetivo Geral.....	44
4.2 Objetivos Específicos .....	44
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 Animais.....	46
5.2 Desenho Experimental .....	46
5.3 Indução do Traumatismo Cranioencefálico .....	46
5.4 Suplementação.....	47
5.5 Campo Aberto .....	47
5.6 Reconhecimento Objeto .....	47
5.7 Análises Bioquímicas.....	48
5.7.1 Atividade da enzima creatina quinase (CK) .....	48
5.7.2 Preparação amostras western blot. ....	49
5.7.3 Determinação da proteína .....	49
5.7.4 Eletroforese .....	50
5.7.5 Anticorpos utilizados.....	50
5.8 Análise histológica.....	51
5.9 Análise Estatística .....	51
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>



## 1. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

Por definição o Traumatismo Cranioencefálico (TCE) é um acometimento comum em todas as sociedades e abrange todo o conjunto de processos que sozinhos ou em combinação podem danificar o encéfalo. É ocasionado por uma força física externa que leva a uma alteração na função cerebral (MENON et al., 2010; SILVER 2005).

Esta condição é considerada um dos principais problemas de saúde pública entre crianças e adolescentes, com taxas elevadas de incapacidade (CROWE et al., 2009). Devido a escassez de estudos nacionais, é necessário analisar dados epidemiológicos internacionais para se ter uma ideia da abrangência desta condição de saúde. Dados da fiscalização australiana revelam que a cada 20 atendimentos no departamento de emergência em hospital pediátrico, um é para atendimento de de casos de TCE. Esses dados fazem desta condição mais comum que queimaduras ou envenenamentos (NOLAN e PENNY, 1992).

Em crianças e adolescentes o TCE representa uma interrupção em seu desenvolvimento normal, com estimativas que variam de 200 a 500 casos para cada 100.000 ao ano (CROWE et al., 2009). A maioria dos casos é caracterizada como leve, com poucas consequências a longo prazo, entretanto, uma porção significativa de jovens sofrerá ferimentos mais graves. Pacientes acometidos TCEs mais fortes experimentarão consequências físicas, cognitivas, educacionais, funcionais e emocionais, exigindo por toda a vida um acompanhamento de profissionais da saúde. Tais necessidades geram uma carga social e econômica significativa para suas famílias e mais amplamente para a comunidade (CASSIDY et al., 2004).

No Brasil, segundo estudo realizado por (FERNANDES et al, 2010) as internações concentram-se na região sudeste (43%), indivíduos do sexo masculino (81,5%) na faixa etária de 14-35 anos, representando 53% do total. Um outro estudo realizado no estado do Ceará com 630 pacientes hospitalizados no Serviço de Neurologia/Neurocirurgia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, no período de 2010 a 2011, apresentou também uma incidência maior em indivíduos do sexo masculino (87%) dentre estes 63,3% se encontram na faixa etária de 10-39 anos, e 18,1% representam aproximadamente faixa etária avaliada no presente estudo, que é entre 10 e 20 anos de idade (ELOIA et al, 2011).



Corroborando estudos nacionais, dados epidemiológicos demonstram que os homens são mais acometidos por TCE que as mulheres, na proporção de 1,5:1 a 1,7:1 nos Estados Unidos, de 4:1 na África do Sul, de 2,7:1 na Austrália e na França de 2:1 (BRUNS e HAUSER, 2003). Também é bem descrito que as causas mais frequentes de TCE são as quedas e acidentes de trânsito (FIGG, BURRY e VANDER KOLK, 2003; CAMERON, RAINER e MAK, 2004; RUY e ROSA 2011; OLIVEIRA et al., 2012), sendo as quedas bastante comuns entre crianças e idosos (JENNETT, 1996). Na verdade, o mecanismo de lesão no TCE está intimamente relacionado aos dados demográficos do local em questão, por exemplo, San Diego nos Estados Unidos está entre as 20 cidades mais seguras do país onde 50% dos TCE foram decorrentes de acidentes relacionados aos meios de transporte e 6% devido às armas de fogo (BRUNS e HAUSER, 2003). Já no Bronx, famoso bairro de Nova York com alta taxa de criminalidade, a maior parte dos TCE foi devido à violência urbana (34%) e 27% relacionado a acidentes de trânsito (BRUNS e HAUSER, 2003).

Deste modo, as causas primárias do TCE variam de acordo com a população envolvida, sendo de suma importância o conhecimento das suas características para que sejam adotadas medidas de prevenção mais efetivas baseadas na realidade do local, na tentativa de reduzir sua incidência e/ou a sua classificação de acordo com a gravidade das lesões.

Desde 1974, quando foi inicialmente descrita por TEASDALE e JENNETT (1974), até os dias de hoje a Escala de coma de Glasgow (ECG) é utilizada para classificar o TCE. Essa escala utiliza para avaliação o nível de consciência, dividindo os pacientes em três categorias: leve, moderado e grave (SAATMAN et al., 2008). A ECG é amplamente utilizada imediatamente após o incidente de lesão. Embora existam tecnologias que auxiliam a classificar os diferentes tipos de enfermidades, a ECG tem em sua essência a simplicidade e a confiabilidade tendo como principal vantagem a reprodutibilidade.

Basicamente os parâmetros da ECG são: A abertura ocular, resposta motora e resposta verbal; e sua pontuação varia de 3 a 15, quanto menor for o total de pontos obtidos, mais profundo é o coma e mais grave o quadro neurológico.

### Escala de coma de Glasgow

<b>Abertura dos olhos (O)</b>	Espontânea	4
	Ao falar	3
	Ao sentir dor	2
	Olhos sempre fechados	1
<b>Melhor resposta motora (M)</b>	Obedecer	6
	Localizar	5
	Reflexo de retirada	4
	Flexão anormal	3
	Resposta extensora	2
	Sem resposta motora	1
	<b>Resposta verbal (V)</b>	Orientada
Conversa confusa		4
Palavras inapropriadas		3
Sons incompreensíveis		2
Sem resposta verbal		1
<b>Escore de coma = (O+M+V)</b>		



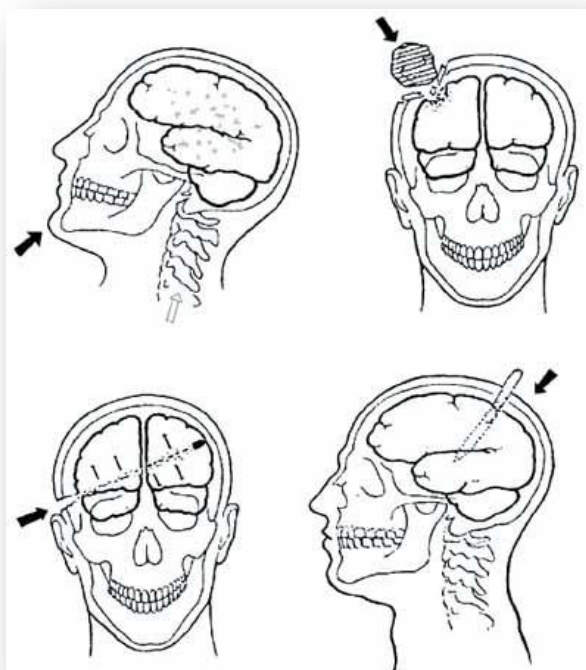
**TABELA 1 - Escala de coma de Glasgow** – Tabela usada para avaliar, em humanos a gravidade do trauma na chegada em unidade de saúde. Adaptada de (KRAUS e CHU 2005).

Para um trauma ser considerado leve os pacientes devem apresentar um score de 13 a 15 na ECG, já os pacientes que obtém um escore entre 9 a 12 enquadram-se em moderado, já para grave o escore deve ser menor que 8 pontos (RIMEL et al., 1982; ANDRADE et al, 1999).

As formas que o encéfalo pode ser ferido são as mais diversas, basicamente foram definidos dois principais mecanismos de lesão: dano por contato e dano por aceleração/desaceleração (NORTJE e MENON, 2004). As lesões provenientes pelo contato são aquelas que resultam do impacto de um objeto sobre a cabeça ou do contato entre o encéfalo com o crânio, estas frequentemente associadas a quedas e perfurações (GENNERALLI e GRAHAM, 2005).

O segundo mecanismo de lesão resulta de forças de aceleração e desaceleração, não necessitando diretamente do impacto do crânio com estruturas externas. Esse tipo de lesão resulta do movimento irrestrito da cabeça que leva o cérebro a se movimentar dentro da caixa craniana (FERREIRA, 2009), ocasionando

tensões de cisalhamento e compressões que agem sobre o tecido cerebral (GENNERALLI e GRAHAM 2005). As principais consequências da lesão de aceleração e desaceleração incluem os hematomas subdurais, os danos generalizados aos axônios neuronais, o rompimento de vasos sanguíneos e as lacerações do tecido cerebral (FERREIRA 2009). Geralmente ocorrem por acidentes automobilísticos e quedas de grandes alturas (GENNERALLI e GRAHAM 2005).



**Figura 1 – Tipos de causas de TCE**

A classificação do TCE quanto à distribuição da lesão é baseada na estimativa clínica neurorradiológica, possibilitando uma divisão da lesão em focais e difusos. No TCE focal, a lesão se restringe a uma única e pequena porção do encéfalo, ocasionada basicamente por contato. Já no TCE difuso, a lesão é causada pela aceleração e desaceleração, comumente associada a acidentes (GENNERALLI e GRAHAM 2005).

A fisiopatologia do TCE compreende diversos fenômenos e classicamente divide-se em dois processos, o dano primário e secundário. Em geral, a lesão primária consiste basicamente no dano mecânico imediato e irreversível provocados no momento do impacto e incluem as fraturas ósseas, danos axônais, meníngeos,

vasculares e morte celular imediata ( GENNERALLI e GRAHAM 2005; SAATMAN et al., 2008). Sendo assim o dano primário não é passível de tratamento podendo apenas ser evitado e/ou amenizado com políticas publicas de prevenção (CASSIDY et al., 2004; FALAVIGNA et al., 2012).

Por outro lado, o dano secundário caracteriza-se como o processo que se inicia em consequência do dano primário, abrangendo todos os eventos metabólicos, celulares e moleculares, estendendo-se dos minutos iniciais até anos após o TCE. As lesões secundárias se desenvolvem por meio de múltiplos processos fisiopatológicos como: edema, desequilíbrio hidroeletrólítico, excitotoxicidade, hipóxia-isquemia, estresse oxidativo e nitrosativo, inflamação, apoptose e necrose celular (WERNER e ENGELHARD, 2007; AARABI e SIMARD, 2009).

É valido ressaltar que o tecido cerebral de ratos jovens é aproximadamente duas vezes mais rigido quando comparado com o tecido cerebral de roedores adultos. Este aumento da rigidez significa que é necessario uma maior quantidade de força para deformar o cerebro em desenvolvimento (PRANGE e MARGULIES, 2002; GEFEN et al., 2003). No entanto, desconhece-se a quantidade de deformação necessaria para produzir lesão cerebral pediátrica, de modo que o aumento da rigidez do tecido não necessariamente indica um beneficio de proteção (PRANGE e MARGULIES, 2002). A diferença nas características do cerebro de adultos e crianças pode dever-se ao grau de mielinização diferenciado existente nas diferentes idades (ARBOGAST e MARGULIES, 1999). As alterações na mielinização cerebral continuam durante toda a adolescência até a idade adulta jovem (PAUS et al., 1999; COURCHESNE et al., 2000; GIORGIO et al., 2008). De fato, durante a fase de mielinização, conforme ocorre o aumento do conteúdo de mielina há uma diminuição do conteúdo liquido do cérebro o que parece ser uma característica que torna o cérebro jovem mais sensível as lesões cerebrais (DAS et al., 1973).

Durante a maturação cerebral, o cérebro altera a sua dependência entre vários substratos metabólicos. No útero, o cérebro em desenvolvimento depende de suprimentos de glicose maternos, logo após o nascimento o cérebro muda brevemente seu metabolismo para utilizar lactato até a amamentação começar. Durante o período de amamentação, o cérebro metaboliza uma combinação de corpos cetônicos e glicose, mas muda a dependência à glicose após o desmame.

Estas alterações no metabolismo do substrato cerebral são acompanhadas por alterações na disponibilidade de substrato sistêmica, transporte de substrato, e atividades de enzimas para o metabolismo do substrato (PRINS, 2012). Durante o período de amamentação, o metabolismo cerebral do animal é voltado para o consumo de cetonas, uma vez que existem maiores concentrações circulantes de cetonas, maior número de transportadores na barreira hematoencefálica, e maiores atividades de enzimas metabolizadoras de cetonas (BOOTH, PATEL e CLARK, 1980; VANNUCCI e SIMPSON, 2003). Durante o período de pico de utilização de cetona, a capacidade do cérebro em desenvolvimento para utilizar beta-hidroxiacetilacetato ( $\beta$ -OHB) é de seis vezes maior do que o cérebro do rato adulto, assim como a taxa de metabolismo de cetona dentro do córtex fronto-parietal (HAWKINS, WILLIAMSON e KREBS, 1971; CREMER, BRAUN e OLDENDORF, 1976; NEHLIG, BOYET e PEREIRA DE VASCONCELOS, 1991). Após o desmame, há uma diminuição nas concentrações de cetona sérica, seguido por uma queda na captação cerebral e, finalmente, uma diminuição da regulação dos transportadores de monocarboxilatos (MCT).

Em contraste com as alterações abruptas no metabolismo cerebral, as mudanças do desenvolvimento no metabolismo da glicose são mais graduais. No nascimento, as concentrações circulantes de glicose equivalem a 50% das concentrações encontradas no adulto. As alterações na disponibilidade de substrato ocorrem antes do aumento da expressão em transportadores de glicose cerebral (Glut 1 e Glut 3) (VANNUCCI e SIMPSON, 2003) e o aumento da atividade de enzimas glicolíticas (LEONG e CLARK, 1984). Estas alterações não perduram até maturação quando as taxas metabólicas de glicose são alcançados (NEHLIG, DE VASCONCELOS e BOYET, 1988).

Durante a fase aguda (1h) depois da lesão por percussão de fluido (LPF), o cérebro de um rato adulto apresenta efluxo indiscriminado de potássio, aumento de glutamato extracelular (KATAYAMA et al., 1990; KAWAMATA et al., 1992), acumulação de cálcio (OSTEEN et al., 2001; ENERSON e DREWES, 2003), e aumento transitório da taxa metabólica cerebral de glicose (CMRglc) (YOSHINO et al., 1991; SUTTON et al., 1994; Hovda et al., 1994). Este aumento inicial da CMRglc é devido ao aumento da energia celular necessária para restaurar o equilíbrio iônico e de manter o potencial de membrana neuronal (Hovda et al., 1996). Após o

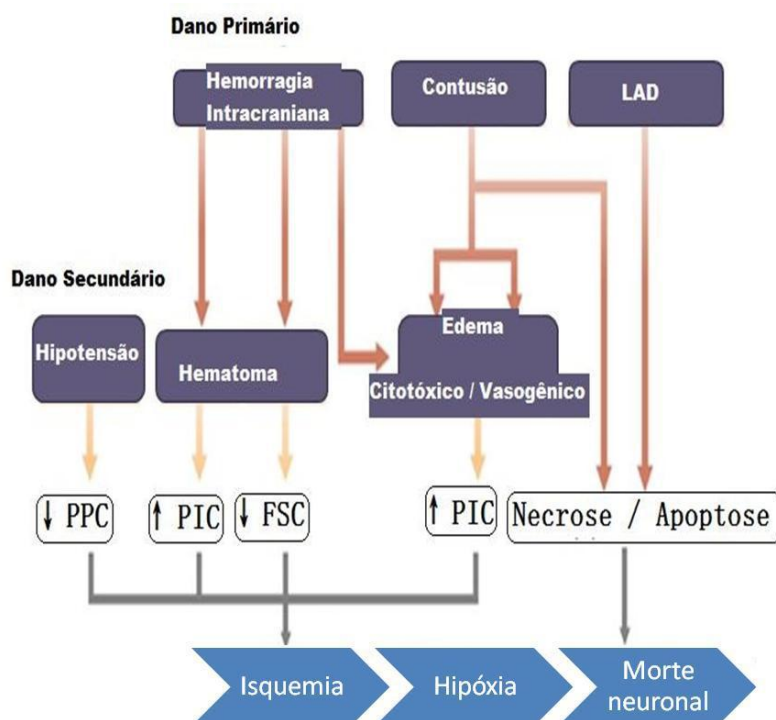
aumento transitório da CMRglc é um período de tempo prolongado (10-14 dias) de depressão metabólica da glicose. Ratos submetidos a LPF aos 17 dias de vida mostraram um aumento imediato na CMRglc, seguido por um período de depressão metabólica da glicose. No entanto, a duração da depressão metabólica da glicose é em torno de tres dias em relação aos adultos (THOMAS et al., 2000). Após lesão por CCI em ratos aos 70 e 35 dias de vida, a depressão CMRglc é maior em magnitude e duração em comparação com alterações após lesão PF.

Nos anos 90, devido aos avanços tecnologicos obteve-se um expressiva diminuição na mortalidade após o TCE devido a manutenção dos parametros fisiologicos, como a pressão de perfusão cerebral (PPC), pressão intracraniana (PIC) e fluxo sanguíneo cerebral (FSC) (NORTH et al., 2012). Estudos demonstram que a manutenção do equilibrio entre a PPC e PIC preserva o tecido cerebral e resgata a area de penumbra, desde que seja possível manter uma FSC adequado para a região fazendo com que as celulas na area da paenumbra sobrevivam (LING e NEAL, 2005; GRANDE, REINSTRUP e ROMNER, 2009).

Em um estudo realizado em porcos no qual foram utilizados três grupos etários de leitões (5-dias "infantil", 1 mês "criança", e 4 meses "adolescente") relatou-se que uma semana após a lesão, os leitões do grupo infantil apresentam menor lesão cortical enquanto o grupo de animais adolescente demonstram um maior volume de lesão. Tais achados sugerem que o cérebro infantil mais jovem é menos vulnerável a lesão aguda e/ou é mais capaz de recuperar mais rapidamente do que nos porcos mais velhos (DUHAIME et al., 2000). Entretanto, outro estudo do mesmo grupo demonstrou que o volume da lesão um dia após o impacto cortical em suínos infantis é maior do que em porcos adolescentes. Por outro lado, quando os suínos infantis foram avaliados 7 e 30 dias após impacto cortical eles apresentaram uma menor lesão quando comparados aos em porcos adolescentes, confirmando que os leitões foram mais suscetíveis a lesões, porém foram capazes de se recuperar mais rapidamente do que os porcos mais velhos.

O cérebro em desenvolvimento mostra claramente uma resposta dependente da idade para o TCE e outras lesões excitotóxicos. Um estudo com ratos mostra que, no TCE induzido no setimo dia de vida, tanto a morte celular por necrose quanto a morte por apoptose ocorrem cada uma em seu próprio periodo de tempo. A necrose parece ocorrer mais rapidamente (6 horas) e o pico de apoptose mais

tardiamente (24 horas) (BITTIGAU et al., 1999). Interessantemente, a maior parte da morte neuronal parece ocorrer através de mecanismos apoptóticos. Por outro lado, os ratos adultos tendem a apresentar necrose substancial, bem como uma onda retardada de apoptose (CONTI et al., 1998).



**Figura 2 - Fisiopatologia do TCE.** A lesão primária (impacto) pode levar diretamente a morte celular. Após a lesão inicial lesões secundárias podem se instalar, como hematoma, edema, hipotensão. Estas alterações causam desequilíbrio entre a PPC e a PIC, o que leva a alterações no fluxo sanguíneo cerebral, gerando isquemia, hipóxia e morte celular. Abreviações: lesão axonal difusa (LAD), pressão de perfusão cerebral (PPC), fluxo sanguíneo cerebral (FSC), pressão intracraniana (PIC). Adaptado de NORTH et al., 2012.

Em decorrência dos processos desencadeados pelo trauma, as principais sequelas resultantes do TCE podem ser divididas em três categorias: físicas, cognitivas e emocionais/comportamentais. As físicas são diversificadas, podendo ser motoras, táteis, visuais entre outras. Já as cognitivas incluem principalmente problemas de atenção, funções executivas e memória (SENATHI-RAJA, PONSFORD e SCHONBERGER, 2010). As incapacidades comportamentais são geralmente a motivação diminuída, perda de autoconfiança, ansiedade, depressão e esta representada comumente por desinibição, irritabilidade e agressividade (LEZAK; HOWIESON; LORING, 2004; YANG et al., 2007; FANN, HART e SCHOMER, 2009; PODELL et al., 2010). Entre as sequelas mais aparentes inclui-se os prejuízos físicos, contudo, a longo prazo, os problemas cognitivos, de

personalidade e comportamento são os mais importantes para a qualidade de vida da pessoa acometida (BURLEIGH, FARBER e GILLARD, 1998; KOSKINEN, 1998).

Alterações de memória podem estar presentes durante todo o desenvolvimento do quadro neurológico após o TCE. Na fase inicial, após um TCE leve, o paciente pode apresentar amnésia, com ou sem perda de consciência, como resultado da concussão. Na fase crônica, as preocupações são normalmente associadas com o aumento da distração, comprometendo a atenção, memória de trabalho, recuperação de informações e disfunção executiva (FLYNN, 2010)



## 2. MEMÓRIA

De forma geral, as alterações de atenção, função executiva e memória são as mais comumente encontradas após o TCE, sendo a reclamação mais frequente a alteração da memória (LEZAK 2004; HOWIESON; LORING, 2004; FLYNN, 2010)

A memória é a função central da cognição humana, pois envolve as habilidades de adquirir, armazenar e evocar informações (LENT 2004). Os principais processos são: a codificação, organização e seleção de informação para o armazenamento. Esse último consiste em reter as informações ao longo do tempo em um sistema organizado e já a evocação trazer a informação armazenada para o nível da consciência (LEZAK 2004; HOWIESON; LORING, 2004; PODELL et al., 2010). Logo “Eu sou quem sou, cada uma é quem é, porque todos lembramo-nos de coisas que nos são próprias e exclusivas, e não pertencem a mais ninguém” (IZQUIERDO 2002). A memória mantém tudo aquilo que se aprendeu ou se vivenciou durante a vida, pois não se nasce com as informações no cérebro, elas são adquiridas e acumuladas na mente, como por exemplo, informações, rostos, lugares e nomes (LENT 2004; SQUIRE e KANDEL, 2003).

Frequentemente, pessoas que sofrem TCE apresentam déficits cognitivos significativos com prejuízos mais evidenciados na área da atenção, memória de trabalho, aprendizagem, funções executivas e memória. Estes pacientes apresentam um comprometimento da capacidade de corrigir os próprios erros e usar o *feedback* para melhorar ou corrigi-los (PODELL et al., 2010), além disso, as funções cognitivas que antes eram automáticas, após o TCE não são mais. Como estratégia para lidar tais incapacitações, a pessoa deve executar essas funções com uma base consciente e intencional (MORRIS, 2007).

### 2.1 Tipos de memória

A aquisição de novos conhecimentos e informações é chamada de aprendizado, já a retenção do que foi aprendido chama-se memória (BEAR 2006). Não existe apenas um tipo de memória, sendo assim criou-se uma classificação quanto ao conteúdo e o tempo de duração.

Quanto ao seu conteúdo, à memória pode ser “declarativa” também chamada de “memória explícita”, a qual inclui todas as memórias que o ser humano pode

trazer a consciência e verbalizar, são fáceis de formar, mas também são fáceis de esquecer, estando relacionada diretamente com fatos e eventos. Outra é a “não-declarativa” também chamada de “memória implícita”, não passa necessariamente pela consciência, nem pode ser facilmente transmitida verbalmente a outras pessoas, pois resulta da experiência (habilidades, hábitos e comportamentos), sendo o tipo de memória mais fácil demonstrar do que relatar (LEES, JONES e KANDEL, 2000; ALBRIGHT 2000; MALLOY DINIZ 2010).

A organização da memória segundo critérios temporais depende diretamente do tempo em que as memórias permanecem disponíveis (ou armazenadas) após terem sido adquiridas. Se a memória puder se evocada apenas por um curto período de tempo após a aquisição é chamada de “memória imediata” ou “memória de trabalho”, isto é, um sistema que fornece armazenamento temporário e manipulações das informações necessárias para tarefas cotidianas como na manutenção temporária de um número telefônico, na resolução de cálculos matemáticos, na leitura de um texto, quando seguimos instruções ou direções, cabe à memória de trabalho manter durante alguns segundos/minutos a informação que esta sendo processada (ALLOWAY et al., 2009; SQUIRE E KANDEL 2003).

Já a memória de longa duração ou longo prazo é aquela que pode ser evocada dias meses ou até anos após seu armazenamento. Nesse tipo de memória, além de processos neurológicos bem estruturados a emoção é um subsídio importantíssimo que dá suporte para a fixação de acontecimentos na memória (PERGHER 2008).

Se esta informação puder ser evocada após minutos a poucas horas após sua aquisição é chamada de memória de curta duração ou de curto prazo. Essa memória pode durar de minutos ou até horas e servem para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente. As memórias de curta duração utilizam circuitos neurais que envolvem entre outras estruturas cerebrais o hipocampo e o córtex entorrinal. A principal função dessa memória é manter as informações “vivas” no cérebro, permitindo que elas sejam evocadas durante o período em que as informações ainda não foram armazenadas na sua forma definitiva (IZQUIERDO et al., 1998; IZQUIERDO et al., 1999).

Esse tipo de memória é muito sensível a perturbações e pode ser eliminada mediante um insulto como o TCE ou crises convulsivas (HELENE E CHAVIER

2007). Por tal motivo, alguns testes comportamentais têm sido utilizados para avaliar o efeito de drogas nos diferentes tipos de patologias. Um teste que serve como exemplo é a tarefa de reconhecimento de objeto, validado e descrito inicialmente por (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). O reconhecimento de objetos é similar aos testes de reconhecimento visual utilizados em primatas e se baseia no comportamento espontâneo dos ratos de explorar elementos desconhecidos. Esse teste não envolve mecanismos de estresse como descargas elétricas ou privação de alimento o que torna a tarefa comparável aos testes de memória utilizados em humanos.

Estudos tem mostrado que a proteína responsável pela ligação entre o metabolismo e a cognição é a proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (SPASIC, CALLAERTS e NORGA, 2009; POTTER et al., 2010). AMPK é ativada sob condições de baixa energia por fosforilação em um sítio serina/treonina cinase (treonina 172) por cinase como: no Fígado cinase B-1 (LKB1) e cálcio/calmodulina dependente da proteína quinase cinase-beta (CAMKK $\beta$ ) (HARDIE, 2008). A ativação sob condições de stress celular ou baixa energia leva AMPK a promover processos que resultam na produção de ATP (JANSEN et al., 2009; INOKI, KIM e GUAN, 2012).

AMPK é uma proteína heterotrimérica composta por uma subunidade catalítica  $\alpha$ , e  $\beta$  e subunidades reguladoras  $\gamma$ . As cinases reguladoras ligam-se à subunidade  $\alpha$  de AMPK, enquanto AMP e ATP competem pela ligação na subunidade  $\gamma$  (HARDIE, 2008). A subunidade  $\gamma$  contém dois domínios, cada um dos quais se liga uma molécula de adenosina (HARDIE, 2007). A ligação de AMP a estes locais conduz à ativação alostérica da AMPK, acarretando em uma mudança conformacional que a disponibiliza o sítio regulatório para a ação das cinases ao mesmo que inviabiliza a inibição e sua atividade por ação das fosfatases (HARDIE, 2004). A combinação de ligação de AMP e fosforilação por quinases leva a um aumento de 1000 vezes na atividade de AMPK (SUTER et al., 2006).

AMPK é expressa em todo o sistema nervoso particularmente em áreas conhecidas por terem maiores taxas de consumo de glicose (PERTSCH et al., 1988; TURNLEY et al., 1999). As áreas de maior expressão de AMPK incluem córtex, hipocampo, cerebelo e medula espinal (TURNLEY et al., 1999).

A fosforilação da AMPK promove processos de produção de energia, e inibe processos anabólicos. AMPK exerce os seus efeitos através de mecanismos tanto de curto prazo quanto de longo prazo para controlar o metabolismo energético das células (AMATO e MAN, 2011b). A ativação da AMPK promove imediatamente processos catabólicos por fosforilação das enzimas reguladoras envolvidas na glicólise e outros processos de produção de ATP. Ativação da AMPK também aumenta a produção de energia a longo prazo, através do aumento da expressão de co-ativadores de transcrição, o que leva ao aumento da expressão de genes que promovem a atividade catabólica no interior da célula (SPASIC, CALLAERTS e NORGA, 2009; HARDIE, ROSS e HAWLEY, 2012).

Alguns dos processos alvo da AMPK bem caracterizados incluem a absorção de ácidos graxos para a oxidação através de Acetil CoA carboxilase-2 (ACC-2), biogênese mitocondrial através do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma- $\gamma$  coativador-1  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) (MERRILL et al., 1997; PEHMOLLER et al., 2009). A ativação de vários substratos de enzimas e de fatores de transcrição tem por objetivo aumentar a produção de ATP dentro da célula. Como mencionado, ela também inibe os processos anabólicos, que consomem energia, incluindo a síntese de proteínas através da inibição da alvo mecanicista da rapamicina (mTOR), regulação da síntese de colesterol por inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, e muitas outras enzimas envolvidas na lipogênese e gliconeogênese (HARDIE, ROSS e HAWLEY, 2012). Assim, a ativação da AMPK resulta geralmente na produção de energia e ATP e na inibição do consumo do mesmo em processos energeticamente dispendiosos.

As funções da AMPK no cérebro têm sido estudadas extensivamente e incluem transporte de glicose neuronal, biogênese mitocondrial e regulação do neurodesenvolvimento e viabilidade neuronal (AMATO e MAN, 2011b). A expressão de transportadores de glicose em neurônios do cerebelo é aumentada após insulto excitotóxico, e esse fenômeno é regulado por AMPK (WEISOVA et al., 2009). O silenciamento da subunidade catalítica da AMPK resulta na diminuição da função mitocondrial, e leva a um aumento da morte neuronal (LI et al., 2010). Recentes estudos tem demonstrado que a ativação de AMPK retarda o envelhecimento no intestino, em uma ação mediada por regulação de transcrição de CREB coativador 1 (CRTC-1) e CREB (Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico) (MAIR

et al., 2011). Na verdade, CREB também é um substrato de AMPK e ativação do CREB depende da fosforilação por AMPK. Dentro dessa ideia, um estudo realizado em hipocampo de ratos demonstrou que a fosforilação do CREB é profundamente afetada na ausência de AMPK, resultando na regulação negativa do BDNF reduzindo a viabilidade celular (HUANG et al., 2015).

CREB está localizado juntamente com vias de transdução de sinal de cAMP e  $Ca^{2+}$ . A ativação da transcrição do CREB depende da sua fosforilação na serina 133 (S133), que é mediada principalmente pela proteína quinase A (PKA) ou  $Ca^{2+}$  / dependente de calmodulina cinase IV (CaMKIV) (CHRIVIA et al., 1993).

Para elucidar o papel de CREB na formação da aprendizagem e da memória, estudos anteriores utilizando camundongos transgênicos demonstraram que a perda da função genética do CREB prejudica a formação de memória de longo prazo sem afetar a memória de curto prazo (BOURTCHULADZE et al., 1994; KIDA et al., 2002; SCOTT et al., 2002). Além disso, camundongos transgênicos com inibição da atividade do CREB também apresentaram déficits de LTP (potenciação de longa duração) no hipocampo (BOURTCHULADZE et al., 1994). Estas descobertas indicam que CREB é fundamental para a consolidação da memória e LTP, sugerindo que o CREB desempenha um papel central neste processo.

Os Genes-alvo do CREB incluem c-fos, proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade (ARC), e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (SHENG, THOMPSON e GREENBERG, 1991; FINKBEINER et al., 1997). Assim, o CREB é responsável por controlar a consolidação da memória e LTP por regular a expressão desses genes. Estudos anteriores demonstraram que o CREB desempenha um papel crítico na formação da memória, não apenas em roedores, mas também em *Aplysia* (lesma do mar) e *Drosophila* (mosca) (SILVA et al., 1998; LEE et al., 2008; KANDEL, 2012).

O BDNF é um dos genes-alvo da ativação de CREB, pertence à família de neurotrofinas polipeptídicas que inclui o fator de crescimento neural (NGF), a neurotrofina-3 (NT3) e a neurotrofina-4/5 (NT4/5). Esse peptídeo é inicialmente sintetizado na forma de um precursor o pro-BDNF, que é quebrado intracelularmente originando a proteína madura BDNFm (MOWLA et al., 2001), que pode formar dímeros não-covalentes estáveis (CHAO, 2003).

Existem duas vias de secreção de BDNF nos neurônios, a via dependente de regulação e a constitutiva. Na via de secreção dependente de regulação, o BDNF é estocado em vesículas grandes que se fundem a membrana plasmática após um aumento de cálcio intracelular. Na via constitutiva, ele é armazenado em grânulos menores e continuamente liberado por um processo de fusão independente de cálcio, que ocorre na ausência de qualquer evento específico. A liberação da neurotrofina pela via dependente de regulação requer o aumento de cálcio intracelular (PARK e POO, 2013).

O aumento do cálcio intracelular pode resultar de um influxo por canais de cálcio dependentes de voltagem ou por receptores NMDA ou pela ativação de estoques de cálcio intracelulares após ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Além disso, a PKA pode regular a cinética de liberação vesicular do BDNF. Os estímulos capazes de levar a liberação de BDNF são diversos, incluindo glutamato, estimulação elétrica, cafeína, entre outros. Essa heterogeneidade nas fontes de cálcio e de estímulos sugere que diversas modalidades de secreção da neurotrofina podem coexistir (KUCZEWSKI et al., 2009).

Os efeitos do BDNF são mediados pela ligação a dois receptores transmembrana diferentes: o receptor de alta afinidade tirosina quinase B (TrkB), que reconhece especificamente BDNF, e o receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75, que reconhece outras neurotrofinas. A ligação de BDNF com TrkB induz a dimerização do receptor, autofosforilação de tirosinas intracelulares específicas e ativação de três cascatas de transdução de sinais diferentes, incluindo MAPK/ERK, PI3K e fosfolipase C (COROMINAS et al., 2007). As vias da MAPK, PI3K, Calcio-Calmodulina e AMPc-PKA regulam CREB, e a ativação deste, por sua vez, leva a transcrição de BDNF (TAO et al., 1998).

As neurotrofinas são essenciais no desenvolvimento, funcionamento, sobrevivência e plasticidade dos neurônios (HUANG e REICHARDT, 2001). Diversos estudos mostram o envolvimento de BDNF na LTP tanto na modulação da transmissão sináptica, na síntese de proteínas dendríticas, na formação de espinhas dendríticas e em modelos animais de aprendizagem e memória (BRAMHAM et al., 1996; KANG e SCHUMAN, 1996; MESSAOUDI et al., 1998; SOULE, MESSAOUDI e BRAMHAM, 2006; HELDT et al., 2007). Essa neurotrofina e suas vias de sinalização intracelular também estão envolvidas nas mudanças neuroadaptativas dos sistemas

dopaminérgico e glutamatérgico que são a base do abuso e dependência a psicoestimulantes (HORGGER et al., 1999; GRIMM et al., 2003; FILIP et al., 2006),

Estudos realizados com animais transgênicos Y134F e DIEDML mostraram a existência de um aumento na expressão de BDNF bem como uma melhora na memória de curto prazo (SUZUKI et al., 2011). Destaca-se, a micro infusão de BDNF ou de um inibidor de BDNF no hipocampo de camundongo WT gera melhora ou prejuízo em relação a memória de curto prazo respectivamente. Além disso, a infusão de uma dose superior de inibidor de BDNF no hipocampo foi necessária para apresentar prejuízo na memória de curto prazo em camundongos DIEDML do que em camundongos WT. Estas observações sugerem que um aumento nos níveis de expressão de BDNF melhora a memória de curto prazo em camundongos Y134F e DIEDM (SUZUKI et al., 2011).

### 3. CREATINA

Em 1832, a creatina (N-[aminoiminometil]-N-metilglicina) foi descoberta pelo cientista francês Michael Eugene Chevreul. Este termo vem do grego *kreas* que significa carne, mas devido a problemas técnicos a creatina apenas em 1847 o cientista sueco Justus Liebig foi capaz de confirmar a sua presença e caracterizar como um constituinte regular das carnes. Em seu estudo Liebig também observou que o músculo de raposas selvagens continha dez vezes mais creatina comparado com raposas que eram mantidas em cativeiro, concluindo que o trabalho muscular resultava no acúmulo dessa substância. No mesmo período, outros pesquisadores identificaram uma nova substância presente na urina, a qual mais foi identificada por Liebig como creatinina, um subproduto da creatina.

O médico alemão Hans Meyer descreveu quase cem anos mais tarde, que o corpo de um ser humano de 70 kg e não vegetariano apresentava cerca de 140 gramas de creatina. Cerca de quatro anos mais tarde (1927) pesquisadores da *Harvard Medical School* e *University of Cambridge*, descobriram a molécula de creatina fosfato ou fosfocreatina.

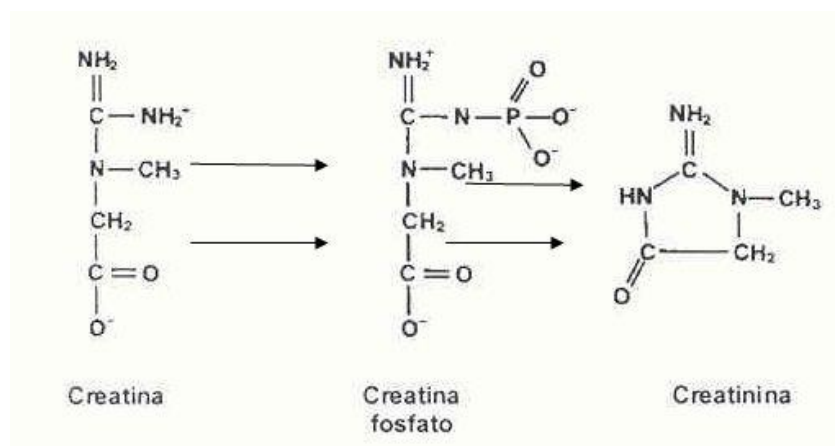
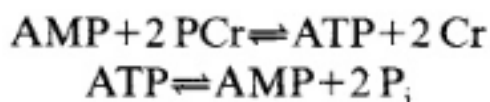


Figura 3 - Estrutura química das moléculas de creatina, fosfocreatina e creatinina.

Em 1930, Lundsgaard demonstrou que a contração muscular era acompanhada por uma maior quebra de fosfocreatina do que de uma produção de lactato, e propôs que a fosfocreatina apresentava um envolvimento central no suporte energético para a contração muscular (DEMANT e RHODES, 1999). Além disso, em 1934, foi descrito a reação na qual o grupamento  $\gamma$ -fosfato da adenosina trifosfato (ATP) é transferido ao grupo guanidino da creatina formando fosfocreatina



(LOHMAN 1934). Dois anos mais tarde foi descrita a reação de conversão de creatina em fosfocreatina por (LEHMANN 1936).



**Figura 4 - Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase** proposto inicialmente por Karl Lohmann (1934). AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato; Cr: Creatina; PCr: fosfocreatina; Pi: fosfato inorgânico.



**Figura 5 - Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase** proposto por Lehmann (1936). ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; Cr: Creatina; PCr: fosfocreatina.

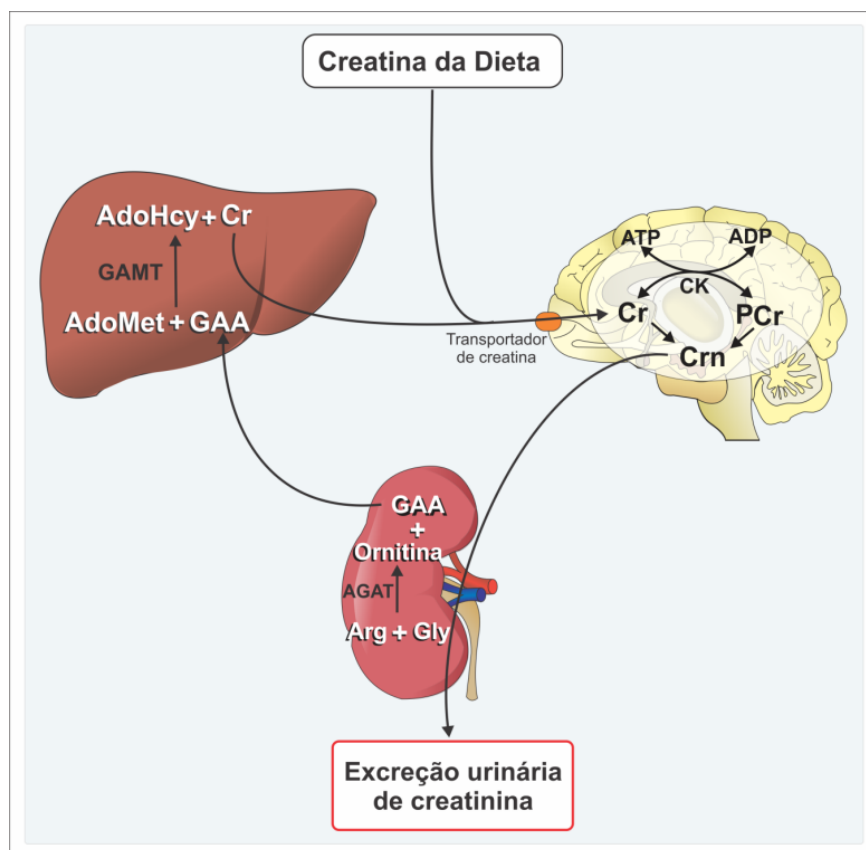
A creatina é um composto guanidínico formado por carbono, nitrogênio e hidrogênio (PERSKY, BRAZEAU e HOCHHAUS, 2003). É obtida através da dieta, sendo as carnes e peixes as principais fontes deste composto. Por outro lado ela também pode ser sintetizada endogenamente nos rins, fígado, pâncreas, testículos e cérebro (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

Alimento	Concentração de creatina (g/kg)
Arenque	6,5 – 10,0
Carne suína	5,0
Carne bovina	4,5
Salmão	4,5
Atum	4,0
Bacalhau	4,0

**Tabela 2 - Concentrações de creatina em alimentos.** (adaptado de MENDES e TIRAPEGUI, 2002).

A biossíntese da creatina ocorre a partir dos aminoácidos glicina e L-arginina, pela formação de guanidino acetato e L-ornitina em uma reação catalisada pela enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT) (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). É bem estabelecido que o guanidinoacetato é sintetizado nos rins e transferido via corrente sanguínea ao fígado (WALKER, 1979;

WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). O guanidinoacetato é então metilado formando creatina, através da enzima guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). A creatina recém-formada entra na corrente sanguínea e pode ser captada por células alvos, como células musculares e neuronais, através de um transportador dependente de íons cloreto e sódio, também chamado de transportador de creatina ou SLC6A8, ou por transportadores de aminoácidos (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).



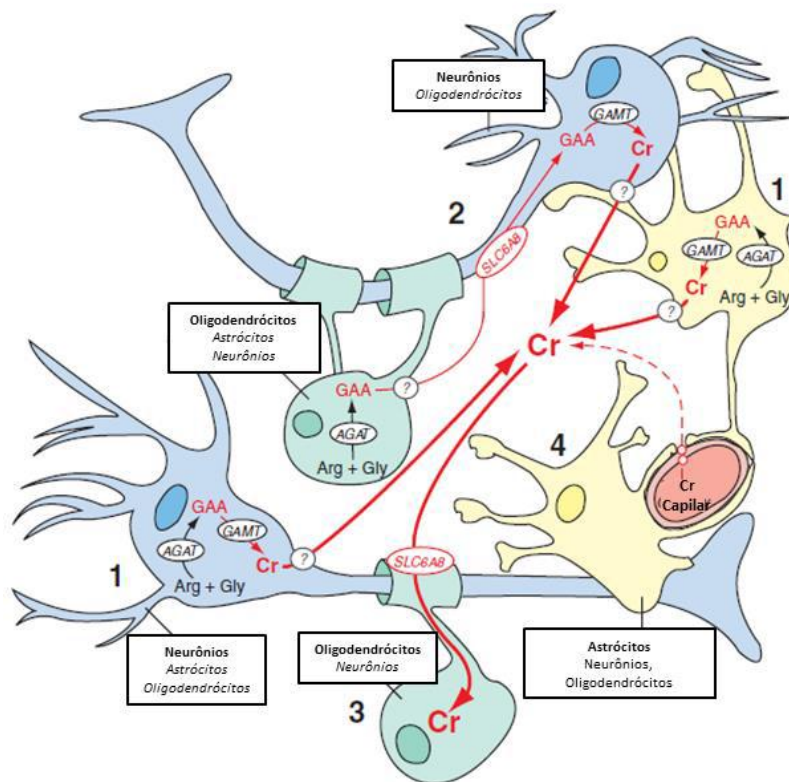
**Figura 6 - Síntese de creatina em mamíferos.** O primeiro passo da biossíntese de creatina ocorre nos rins, em que arginina e glicina são convertidas pela ação da L-arginina/glicina amidino transferase (AGAT) em guanidinoacetato (GAA) e ornitina. Na segunda etapa o guanidinoacetato proveniente dos rins é transferido através da corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma metilação pela enzima guanidinoacetato metil transferase (GAMT), sendo então sintetizada a molécula de creatina. Esta sai do fígado através da corrente sanguínea e então chega a tecidos alvos como o músculo e cérebro. A creatina então pode ser fosforilada pela enzima creatina cinase (CK) e formar fosfocreatina. Tanto creatina quanto fosfocreatina podem ser convertidas em creatinina em uma reação espontânea não enzimática (cerca de 2% do total de creatina por dia). A creatinina é difundida para fora das células e é excretada na urina. AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, Arg: arginina, CK: creatina cinase, Cr: Creatina, Crn: creatinina, GAA: Guanidinoacetato, Adohcy: S-Adenosil-Homocisteína, Adomet: S-Adenosil-L-Metionina, Arg: Arginina, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, PCR: fosfocreatina.

Uma vez no tecido, a creatina pode ser convertida a fosfocreatina, reação catalisada pela enzima creatina quinase (CK) ou sofrer metabolismo espontâneo não enzimática (GREENHAFF, 1996; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

Na década de 70, estudos demonstraram que o cérebro de mamíferos também pode sintetizar creatina (VAN PILSUM, STEPHENS e TAYLOR, 1972). Outros trabalhos comprovaram que as enzimas AGAT e GAMT também são expressas no sistema Nervoso Central (SNC) (BRAISSANT et al., 2001; TACHIKAWA et al., 2004; TACHIKAWA et al., 2007).

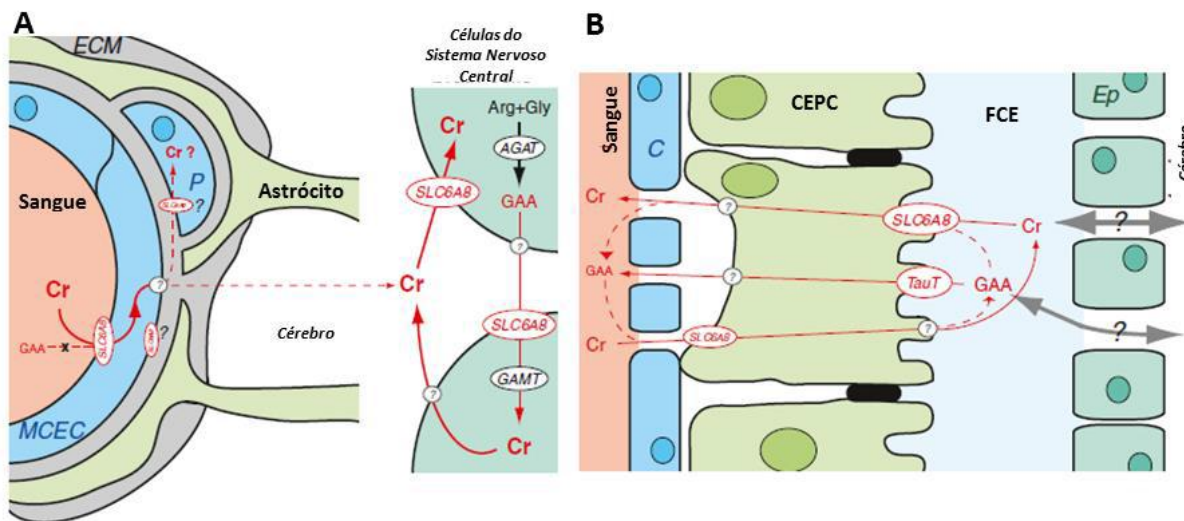
Quanto ao sistema de transporte à creatina entra na corrente sanguínea por difusão e ela pode ser captada pelos tecidos corporais (células sanguíneas vermelhas e brancas, musculo esquelético e cardíaco, retina, espermatozoides e cérebro) (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000), através de transporte ativo dependente de íons cloreto e sódio, também chamado de transportador de creatina I ou SLC6A8, encontrado predominantemente no encéfalo, coração, musculatura esquelética, rins e fígado ou transportador de aminoácidos (BRAISSANT et al., 2010).

O SNC apresenta células que co-expressam AGAT e GAMT e sintetizam a molécula de creatina (principalmente neurônios). Existem também células que somente expressam AGAT (oligodendrócitos), sintetizando GAA e liberando-o no espaço extracelular, também existem algumas células que expressam somente GAMT, que captam o GAA através do SCL6A8, assim completando a síntese de creatina. (BRAISSANT et al., 2010). Tanto neurônios, quanto astrócitos sintetizam e captam creatina, sendo que a concentração intracelular deste composto no SNC deve-se prioritariamente a sua captação do meio extracelular e secundariamente por sua síntese. (CARDUCCI 2013)



**Figura 7 - Modelo de síntese e transporte de creatina no SNC.** 1) Células que coexpressam AGAT e GAMT e sintetizam a molécula de creatina (principalmente neurônios), 2) Algumas células que somente expressam AGAT (principalmente oligodendrócitos), sintetizando GAA e liberando-o ao espaço extracelular e algumas células que somente expressam GAMT (neurônios) captam o GAA através de SLC6A8 e assim completam a síntese de creatina, 3) Algumas células expressam somente SLC6A8 e são chamadas de “utilizadoras de creatina” (principalmente oligodendrócitos), 4) Algumas células isentas de AGAT, GAMT e SLC6A8 (principalmente astrócitos). AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, Cr: Creatina, GAA: Guanidinoacetato, Arg: Arginina, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, SLC6A8: Transportador de creatina (Adaptado de BRAISSANT *et al.*, 2010).

A creatina é captada da periferia pelas células do SNC através do SCL6A8 expresso nas células endoteliais de microcapilares na barreira hematoencefálica (BHE) e a maioria dos astrócitos não apresentam este transportador. Em condições normais, o GAA ou a creatina vão das células do epitélio endotelial até o fluido cérebro-espinhal e então voltando até as células sanguíneas, assim o GAA regressa a periferia preferencialmente através do transportador de taurina (BRAISSANT, 2012)



**Figura 8- Modelo de transporte de creatina e guanidinoacetato através da barreira hematoencefálica e do fluido cérebro-espinal.** - A) As células do SNC captam a creatina da periferia através de SLC6A8 expressa nas células endoteliais de microcapilares (MCEC) na barreira hematoencefálica. Entretanto, os astrócitos que fazem contato com a barreira hematoencefálica não apresentam SLC6A8 dificultando a difusão da creatina ao longo da matrix extracelular (ECM). B) Células epiteliais do plexo coroide (CEPC) captam creatina da barreira hematoencefálica e do fluido cérebro-espinal (FCE). Em condições fisiológicas o guanidinoacetato (GAA) vai do fluido cérebro-espinal até as células sanguíneas através das CEPC, e assim o ácido GAA regressa a periferia preferencialmente através do transportador de taurina (TauT). AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, CEPC: Células epiteliais do plexo coróide, Cr: Creatina, FCE: fluido cérebro-espinal; GAA: Guanidinoacetato, Arg: Arginina, ECM: matrix extracelular, Ep: Epitélio Ependimal, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, MCEC: Células endoteliais de microcapilares, P: Pericito, SLC6A8: Transportador de creatina, Taut: Transportador de taurina (Adaptado de BRAISSANT, 2012).

### 3.1. Creatina quinase/fosfocreatina

É bem descrito que existem 3 isoformas da CK no citosol celular, estas exclusivamente diméricas, compostas por duas subunidades podendo ser duas M referente á isoforma muscular (MM-CK), duas B referente a isoforma cerebral (BB-CK) ou então até uma combinação de uma subunidade M e B (MB-CK) e estas podem estar solúveis ou associadas com estruturas subcelulares como por exemplo o reticulo sarcoplasmático no musculo (WALLIMANN, SCHLOSSER e EPPENBERGER, 1984; KRAUSE e JACOBUS, 1992; KORGE, BYRD e CAMPBELL, 1993).

Essa enzima também é encontrada na mitocôndria de vertebrados. Existe isoforma da CK com particularidades funcionais dependentes dos tecidos onde são

encontradas, como por exemplo, a sarcomérica é encontrada no músculo estriado, enquanto a ubíqua é encontrada no cérebro, rins e esperma (WALLIMANN e HEMMER, 1994; KALDIS et al., 1996; BOERO et al., 2003).

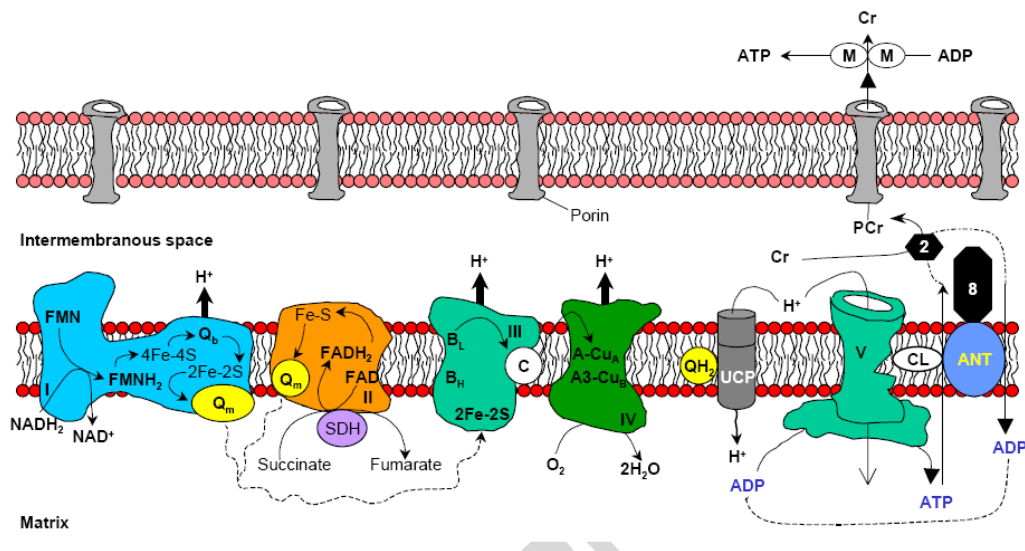
A creatina nos tecidos pode ser fosforilada pela CK mitocondrial, sendo convertida em fosfocreatina e então é difundida para o citoplasma, estando disponível para regeneração imediata de ATP em situações de aumento de trabalho celular. Portanto o ADP gerado é rapidamente reciclado pela mitocôndria na síntese de nova molécula de ATP. Esta alta eficiência da CK mitocôndrial se deve a sua localização, por se encontrar na superfície externa da membrana mitocondrial interna acoplada através de uma força eletrostática. (LIPSKAYA et al., 1982; WENGER et al., 1985; BROOKS e SUELTER, 1987; LIPSKAYA, GEIGER e BESSMAN, 1995). Outros estudos demonstram que essa enzima parece também ser encontrada na crista mitocondrial (WEGMANN et al., 1991; KOTTKE, WALLIMANN e BRDICZKA, 1994).

Também a CK mitocondrial, pode estar acoplada ao translocador de nucleotídeo de adenina. Desta forma, o ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa na mitocôndria chega até o sítio ativo da CK mitocondrial através do translocador de nucleotídeo de adenina, ao mesmo tempo em que o ADP é transportado de forma contrária até os complexos da cadeia transportadora de elétrons (SAKS, KHUCHUA e KUZNETSOV, 1987; SAKS et al., 1994).

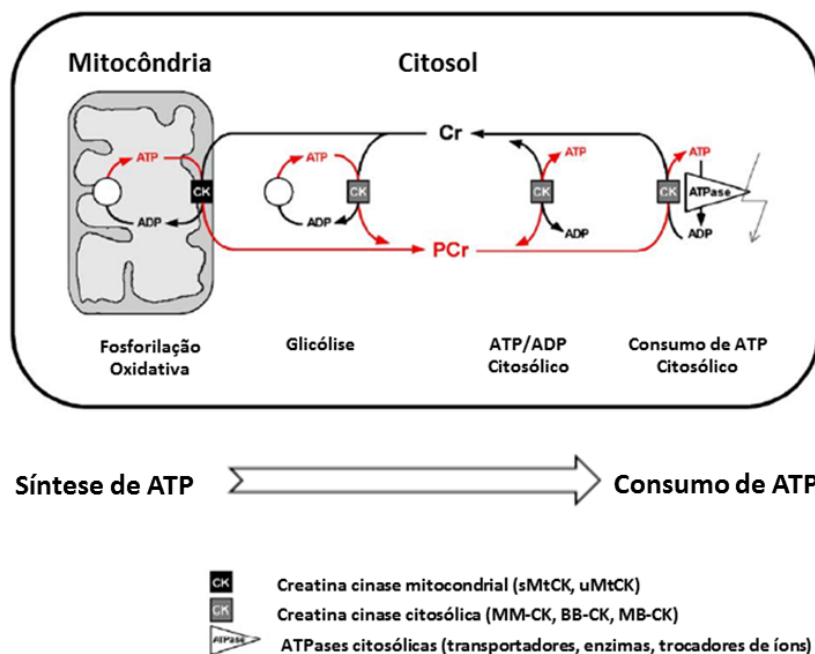
A ação da CK, na conversão da creatina em fosfocreatina, faz com que a creatina seja mantida no interior da célula, essa mudança molecular evita a difusão da creatina para o meio extracelular (GREENHAFF, 1996). Trabalhos têm mostrado que em casos de baixo pH ou ATP, a reação favorece a geração de ATP, quando o caso se inverte, temos elevação do ATP e do pH, o que favorece a geração de fosfocreatina (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

O transporte do ATP sintetizado até os sítios de utilização é necessário. Assim, acredita-se que a creatina e a fosfocreatina sejam muito mais difusíveis que o ATP e o ADP, respectivamente, e isso faz com que esse sistema acople os sítios de produção de ATP aos sítios de utilização do mesmo (CLARK, 1997).

Tanto creatina quanto fosfocreatina podem sofrer degradação de forma não enzimática e irreversivelmente a creatinina, sendo posteriormente eliminada por filtração glomerular renal (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).



**Figura 9 - Acoplamento da síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons e o sistema creatina cinase/fosfocreatina.** A molécula de ATP sintetizada através da cadeia transportadora de elétrons entra no espaço intermembranoso mitocondrial através de translocases (que promovem também uma liberação de ADP na matriz mitocondrial). Dentro do espaço intermembranoso o ATP doa um fosfato para a formação de fosfocreatina em uma reação catalisada pela enzima creatina cinase mitocondrial (mtCK). A fosfocreatina se difunde para o meio citosólico através de poros mitocondriais e no citosol ela é reconvertida a creatina pela ação da enzima creatina cinase citosólica (exemplificada na figura através da isoforma MM-CK) e liberando uma molécula de ATP necessária para diversos processos celulares. (2) creatina cinase mitocondrial; (8) ATP (adaptado de BAKER e TARNOPOLSKY, 2003).



Síntese de ATP → Consumo de ATP

- Creatina cinase mitocondrial (sMtCK, uMtCK)
- Creatina cinase citosólica (MM-CK, BB-CK, MB-CK)
- ATPases citosólicas (transportadores, enzimas, trocadores de íons)

**Figura 10 - Sistema creatina cinase/fosfocreatina.** As isoenzimas creatina cinase mitocondrial (sMtCK, uMtCK) e creatina cinase citosólica (MM-CK, BB-CK, MB-CK) são específicas para cada



compartimento celular. Estas enzimas estão associadas com o ATP sintetizado vindo de processos metabólicos, como a fosforilação oxidativa e glicólise, e associados com o consumo de ATP em funções celulares através de ATPases. Devido ao alto poder de difusão da fosfocreatina em comparação com o ATP, este sistema apresenta um perfil de tampão energético espacial e temporal (adaptado de SCHLATTNER, TOKARSKA-SCHLATTNER e WALLIMANN, 2006).

Há algumas décadas, a literatura vem relatando as propriedades antioxidantes da creatina. Nosso laboratório evidenciou também esta propriedade, no entanto, na presente dissertação darei ênfase as propriedades anti-inflamatórias deste composto.

A creatina é amplamente utilizada por atletas desde os anos 90, estudos demonstram que em situações de treino muscular vigoroso a creatina apresenta uma redução da inflamação muscular (SANTOS et al., 2004; DEMINICE et al., 2013). Promovendo uma *downregulation* de receptores tipo-toll ativado por antígenos bacterianos e virais, sugerindo um efeito imunossupressor deste composto (LELAND, MCDONALD e DRESCHER, 2011). Um estudo mostrou que a creatina parece inibir a permeabilidade endotelial, adesão de neutrófilos, expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. Desta forma, impede o processo inflamatório mediado por células endoteliais (NOMURA et al., 2003).

Atletas de uma prova de corrida de 30 quilômetros que suplementaram com creatina por cinco dias, apresentaram uma redução nos níveis de fator de necrose tumoral- $\alpha$ , prostaglandina  $E_2$  e atividade da lactato desidrogenase no músculo (SANTOS et al., 2004). Outro estudo demonstrou que a suplementação com creatina reduz os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\alpha$  após uma competição de corrida “*ironman*” (BASSIT, CURI e COSTA ROSA, 2008). Outros atletas de “*ironman*” que suplementaram com creatina reduziram diversos parâmetros inflamatórios plasmáticos com a atividade das enzimas lactato desidrogenase, aldolase, ácido oxalacético glutâmico transaminase e da ácido pirúvico glutâmico transaminase (BASSIT et al., 2010). Em contraponto, um estudo recente demonstrou que a suplementação com creatina não reverteu os danos inflamatórios no músculo induzido por uma contração muscular excêntrica (SILVA et al., 2013)

Ademais, um estudo demonstrou que a creatina possui atividade anti-inflamatória em alguns ensaios inflamatórios, similar a muitos agentes anti-



inflamatórios não esteroidais (KHANNA e MADAN, 1978; KHANNA e TAHASHILDAR, 1985). Além disso, nesse mesmo estudo a creatina apresentou atividade analgésica em ratos (KHANNA e MADAN, 1978; KHANNA e TAHASHILDAR, 1985).

Segundo SESTILI et al. (2009), a creatina parece prevenir processos apoptóticos e necróticos frente a diversos insultos como peróxido de hidrogênio, ácido 3-nitropropionico (BRUSTOVETSKY, BRUSTOVETSKY e DUBINSKY, 2001), glutamato (BREWER e WALLIMANN, 2000; BRUSTOVETSKY, BRUSTOVETSKY e DUBINSKY, 2001; GENIUS et al., 2012), peptídeo  $\beta$ -amilóide (BREWER e WALLIMANN, 2000), haloperidol (JURAVLEVA et al., 2003), dentre outros. Além disso, a combinação de creatina com piruvato parece prevenir a redução de espinhos dendríticos na região CA1 do hipocampo de ratos com fenilcetonúria (DOS REIS et al., 2013).

Pacientes que têm uma deficiência congênita de GAMT têm uma baixa síntese de creatina, e mostram atrasos de desenvolvimento, perturbações extrapiramidais de movimento e convulsões (STOCKLER et al., 1997). A suplementação com creatina também melhora o comprometimento neurológico dos pacientes afetados por esta doença rara (STOCKLER e HANEFELD, 1997; VAN DER KNAAP et al., 2000).

Quanto à segurança de realizar a suplementação com creatina, e concluiu-se que esta não tem quaisquer efeitos prejudiciais nos seres humanos. Houve um relato de alguma disfunção renal num paciente que tinha glomerulonefrite, o que não foi replicado em outros pacientes. Há relatos de que a suplementação com creatina pode causar uma elevação dos níveis de creatinina e segundo estudos isso não parece ter quaisquer efeitos adversos. A suplementação com creatina prolongada não parece alterar função de filtração renal (POORTMANS et al., 1997; POORTMANS e FRANCAUX, 2000).

Creatina para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica melhora o desempenho motor, e a sobrevivência prolongada de camundongos G93A (KLIVENYI et al., 1999). Além disso, a suplementação com creatina protege contra a perda de neurônios na substância negra, córtex motor, e redução da extensão dos danos oxidativo.

Um trabalho de nosso laboratório revelou que creatina administrada intrahipocampalmente melhorou a retenção da memória espacial mediado por um aumento na atividade da proteína quinase  $Ca^{2+}$ /calmodulina-2 (CaMK-2) e da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), sugerindo que estas vias sejam extremamente importantes para a ação da creatina sobre a memória.

O traumatismo cranioencefálico tem sido chamado de "epidemia silenciosa" nos Estados Unidos nos últimos anos por causa de sua maior carga médica e financeira. O TCE afeta cerca de 1,7 milhões de pessoas anualmente e contribui para 30,5% de todas as mortes relacionadas a lesões em os EUA. Um subgrupo importante desta população são crianças e adolescentes na faixa etária de 0 a 14 anos, dos quais meio milhão já deu entrada no departamento de emergência para TCE (FAUL ET AL., 2010). TCE juvenil é a principal causa de morte e incapacidade em crianças e adolescentes (SCHNEIER et al., 2006), com prejuízos a longo prazo em habilidades motoras e cognitivas, incluindo déficits no funcionamento intelectual, atenção, memória, linguagem, sensório-motor, habilidades visuais-espaciais e executivas (ADELSON e KOCHANNEK, 1998; ADELSON et al., 1998).

Entre as crianças que sobrevivem, existe uma percentagem significativa que apresenta dificuldades comportamentais e de aprendizagem, e estima-se que 80% destes apresentam dificuldades educacionais especiais ou necessitam de modificações no ambiente educacional (CARVALHO ET AL. 2007, LOBATO 2006).

Devido à escassez de estudos abrangendo esta faixa etária, iniciamos a busca por uma terapia que pudesse amenizar as sequelas desencadeadas pelo TCE. Neste contexto surge a creatina, um composto cujo papel SNC está bem descrito, porém não há na literatura estudos relacionando a creatina e o TCE em animais jovens buscando um via de ação da creatina com o intuito de amenizar o déficit cognitivo gerado.

---

**OBJETIVOS**

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da suplementação com creatina nos danos cerebrais induzido pelo traumatismo cranioencefálico (TCE) em ratos jovens.

### **4.2 Objetivos Específicos**

A. Verificar se os animais jovens submetidos ao TCE apresentam déficit cognitivo quinze dias após a lesão e se a suplementação com creatina possui efeito protetor.

B. Verificar se a suplementação com creatina altera a atividade da enzima creatina quinase (CK) quinze dias após o TCE em ratos jovens.

C. Verificar o envolvimento da expressão das proteínas AMPK, CREB, p-CREB e BDNF no déficit cognitivo induzido pelo TCE em ratos jovens;

D. Verificar se os animais jovens submetidos ao TCE apresentam dano histológico quinze dias após a lesão e se a suplementação com creatina possui efeito protetor;

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados ratos jovens machos (35 dias), mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}$  C, com alimentação e água à vontade. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com aprovação da Comissão de ética em uso animal da Universidade Federal de Santa Maria nº 086/2014.

### 5.2 Desenho Experimental

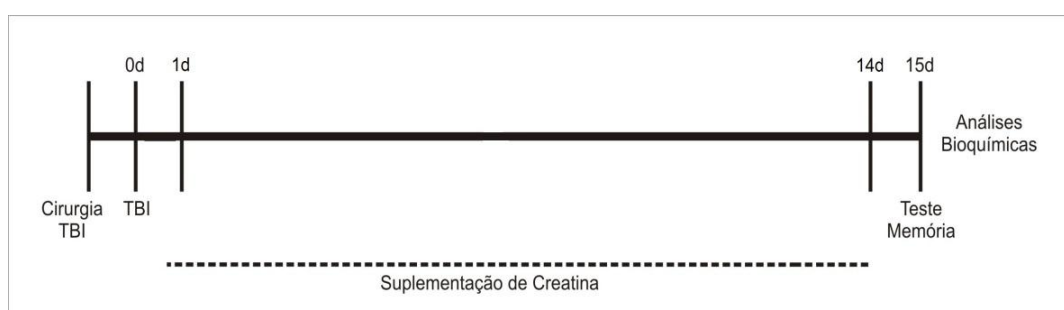


Figura 11 – Desenho Experimental

Os animais foram recebidos do biotério central no vigésimo primeiro dia de vida (data de desmame), foram acomodados em caixas acrílicas com no máximo cinco animais por caixa. No trigésimo quarto dia de vida os animais foram submetidos a uma cirurgia para a implantação de uma cânula. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao TCE por percussão de fluido, posteriormente a cânula foi retirada e a sutura do escalpo realizada. Vinte e quatro horas após o TCE foi iniciada a suplementação com creatina por via oral duas vezes ao dia, por um período de quatorze dias. No décimo quinto dia os animais foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento de objeto e ao final da tarefa os animais foram eutanasiados para a realização das análises bioquímicas.

### 5.3 Indução do Traumatismo Cranioencefálico

O modelo de TCE adotado é o de lesão por percussão de fluido lateral. A indução do TCE foi adaptada do modelo de (D'AMBROSIO et al., 2004). Para isso, os animais foram anestesiados com quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitonealmente e colocados em aparelho estereotáxico em ambiente aquecido

(25°C). Após a exposição do osso parietal direito foi realizada uma perfuração no centro do mesmo com 3 mm de diâmetro para fixação do sistema de percussão fluida. Vinte e quatro horas após a fixação do sistema, o animal foi novamente anestesiado com isoflurano e, posteriormente acoplado ao sistema produtor e um pulso de pressão causado pelo deslocamento de uma coluna fluida (solução salina estéril apirogênica) sobre a dura máter exposta, gerando uma pressão local estimada de 3,5-4 atm. Após a indução do TCE o animal será mantido em base aquecida por mais meia hora. Animais sham-operados foram submetidos a um processo idêntico, com exceção do FPI.

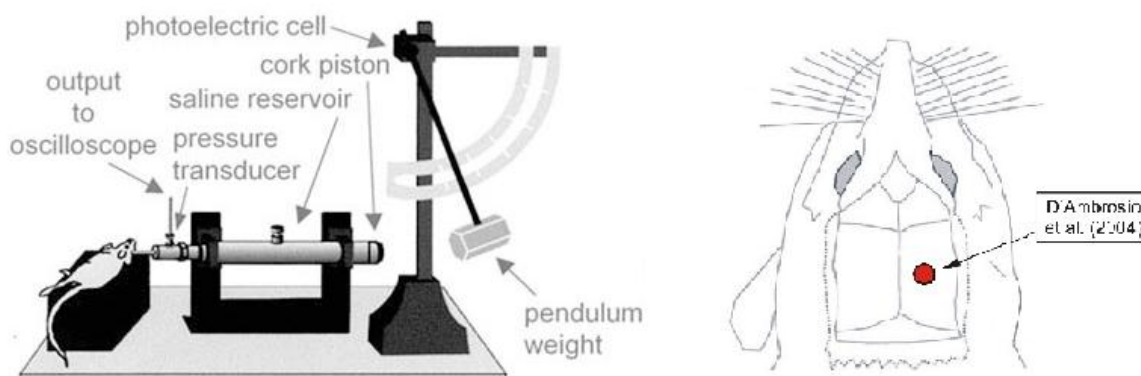


Figura 12 – Indução do TCE por LPF e Localização craniecotomia

#### 5.4 Suplementação

Os animais foram aleatoriamente separados, para receber a suplementação com Cr (300 mg / kg, p.o), suspensa em CMC a 0,5% ou veículo (CMC) duas vezes ao dia por um período de 14 dias.

#### 5.5 Campo Aberto

O aparelho consiste em uma arena metálica de 50 cm de diâmetro, o piso é dividido por linhas pretas em 9 quadrantes. Foi registrado, durante 10 minutos, o número de quadrantes cruzados com as quatro patas, para avaliar a atividade motora “crossing” e também será monitorado o número de elevações a fim de avaliar a atividade exploratória “rearing” (PIETA DIAS et al., 2007).

#### 5.6 Reconhecimento de Objetos

A tarefa de campo aberto servirá com ambientação para os animais devido ao teste ocorrer no mesmo ambiente e arena, 24 horas após a ambientação os animais voltarão para a arena por 10 min, para explorar os objetos iguais (A e A). 4 horas

após os animais voltarem para arena por 10 min para explorar o objeto que já é conhecido e um objeto novo (A e B), o índice de discriminação foi dado através da fórmula (tempo gasto no objeto novo menos o tempo gasto no objeto conhecido dividido pelo tempo gasto no objeto novo mais o tempo gasto no objeto conhecido multiplicado por 100) (PIETA DIAS et al., 2007).

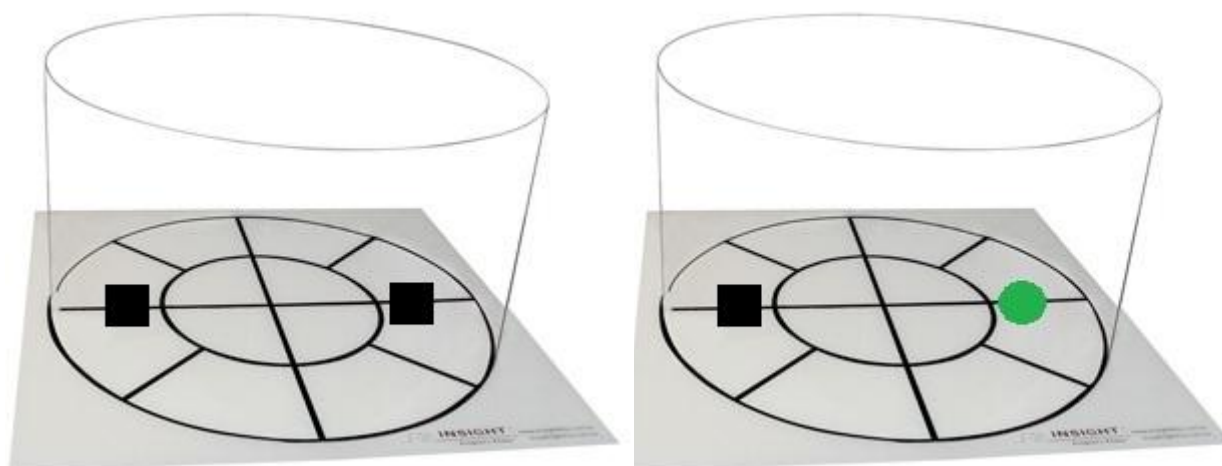


Figura 13 – Arena Reconhecimento de Objeto

## 5.7 Análises Bioquímicas

### 5.7.1 Atividade da enzima creatina quinase (CK)

Imediatamente após a eutanásia, o córtex ipsi lateral foi cuidadosamente removido e homogeneizado em uma solução Tris HCl 50mM, para a determinação da Creatina Quinase (CK) foi utilizado kit Bioclin, o processo envolve a medida da atividade de CK na presença de um anticorpo contra a fração M. Este anticorpo inibe completamente a atividade do CK-MM e a fração M do CK-MB, sem, entretanto, afetar a atividade da subunidade B do CK-MB e do CK-BB.

Reagentes utilizados: Número 1 - Tampão - Contém: Acetato de Imidazol (pH 6,7) 100 mmol/L, Glicose 20 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, NADP<sup>+</sup> 2 mmol/L, Hexoquinase 3500 U/L, Acetato de Magnésio 10 mmol/L, N-Acetilcisteína 20 mmol/L, Anticorpo Policlonal Anti CK-M suficiente para inibir até 2.000 U/L de CK-MM. Número 2 - Enzima - Substrato - Contém: Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase 2000 U/L, Creatina Fosfato 30 mmol/L, ADP 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L, Diadenosina Pentafosfato 10 mmol/L.



Foi utilizado na proporção (1/1) (v/v) dos reagentes 1 e 2 (reagente de trabalho), foi pipetado 1mL do reagente de trabalho e 40  $\mu$ L de amostra, incubada por 5 minutos a 37°C, realizar a leitura no 5º, 6º, 7º e 8º minuto. Para Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ( $\Delta A/\text{min.}$ ) e utilizar este valor para cálculo do resultado. CK-MB (U/L) 340 nm =  $\Delta A/\text{min} \times 8254$  e dividido pela proteína

### 5.7.2 Preparação amostras western blot.

Imediatamente após a eutanásia, o córtex ipsi lateral foi cuidadosamente removido e homogeneizado em uma solução contendo: T-PER (detergente patenteado, Bicina 25mM e NaCl 150mM pH 7,6) Thermo Scientific.. Inibidor de fosfatase contendo Fluoreto de Sódio (NaF) 25mM,  $\beta$ -glicerofosfato do Sódio pentahidratado ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHOP(O)(ONa)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O) 250mM e ortovanadato de sódio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 50mM. Também um coquetel de inibidores de proteases fornecido por Sigma Aldrich. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 10.000G por cinco minutos a 4°C e foi utilizado o sobrenadante. Foi acrescentado ¼ de tampão Laemmli contendo  $\beta$ -mercaptoetanol, Tris HCl 0,5M, Dodecil Sulfato de Sódio, Azul de Bromofenol e Glicerol. Onde o SDS (dodecil sulfato de sódio) é responsável por desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades. Por fim as amostras foram encubadas por cinco minutos a 95°C para ocorrer à desnaturação da molécula.

### 5.7.3 Determinação da proteína

O teor de proteína foi determinada espectrofotometricamente através do método de ácido bicinonínico utilizando um kit comercial disponível (kit de Ensaio de proteína BCA Pierce) o qual é um detergente compatível com o ácido bicinonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Este método combina a redução bem conhecido de Cu<sup>+2</sup> de Cu<sup>+1</sup> pela proteína num meio alcalino (método do biureto) com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do cátion cuproso (Cu<sup>+1</sup>) com um reagente único contendo ácido bicinonínico. O produto da reação de cor roxa do presente ensaio é formada quelando duas moléculas de BCA com um íon cuproso. Este complexo solúvel em água exibe uma forte absorvância a 562 nm, que é quase linear com o aumento das

concentrações de proteína ao longo de uma ampla gama de trabalho (20-2,000 ng / ml). O método BCA não é um método de ponto final verdadeira; isto é, a cor final continua a desenvolver-se. No entanto, a seguir à incubação, a taxa de desenvolvimento de cor contínua é suficientemente lenta para permitir que um grande número de amostras sejam analisadas em conjunto. A estrutura macromolecular da proteína, o número de ligações peptídicas e a presença de quatro aminoácidos particulares (cisteína, cistina, tirosina e triptofano) são referidos como sendo responsável pela formação de cor com BCA. Albumina de soro bovino (1mg/mL) foi utilizada como padrão.

#### 5.7.4 Eletroforese

Foi utilizada uma concentração de 20µg de proteína para cada amostra e então para eletroforese foi utilizado gel de 10% SDS-poliacrilamida e transferida para membrana de transferência de fluoreto de polivinilidene (PVDF), bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA) em tampão Tris-Salina (TBS) por uma hora e então encubada overnight a 4°C com anticorpo primário, lavada por três vezes de 10 minutos com tampão Tris-Salina contendo Tween 20 (TBS-T) e encubada por quatro horas com anticorpo secundário e novamente lavada três vezes com TBS-T, reveladas pelo método de quimiluminescência utilizando ECL (Pierce). Para a quantificação das bandas foi utilizado o programa Image J.

#### 5.7.5 Anticorpos utilizados

##### Primários :

Proteína	Origem	Fabricante	Lote
AMPK $\alpha$ 1	Anti habbit	Millipore	2277856
CREB	Anti habbit	Millipore	2322546
p-CREB	Anti habbit	Millipore	2326258
BDNF	Anti habbit	Millipore	2138546

##### Secundário

Proteína	Fabricante	Lote
Goat Anti habbit igG HRP	Sigma Aldrich	073M4773
Goat Anti habbit IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology	L0312

### **5.8 Análise histológica**

Após a tarefa de reconhecimento de objeto os animais foram profundamente anestesiados com Tiopental, perfundidos transcárdialmente com 300mL de solução salina (0,9%) heparinizada (1.000 UI/mL) seguido por 300mL de formoldeído (4%) em PBS (0,1M), logo após os cérebros foram cuidadosamente removidos do crânio. O método para medição do volume de lesão foi realizado de acordo com ZIEBELL et al (2011), com algumas alterações, foram utilizadas dez fatias de 40µm a partir do bregma, espaçadas por uma distância de 500µm, coradas com hematoxilina e eosina e digitalmente fotografadas. A área da lesão cortical foi calculada usando um software de análise de imagem "Imagem J" (NIH, Bethesda, MD, EUA).

### **5.9 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por análise de variância duas vias (ANOVA). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, quando apropriado. Somente valores de  $P < 0,05$  foram apresentados.

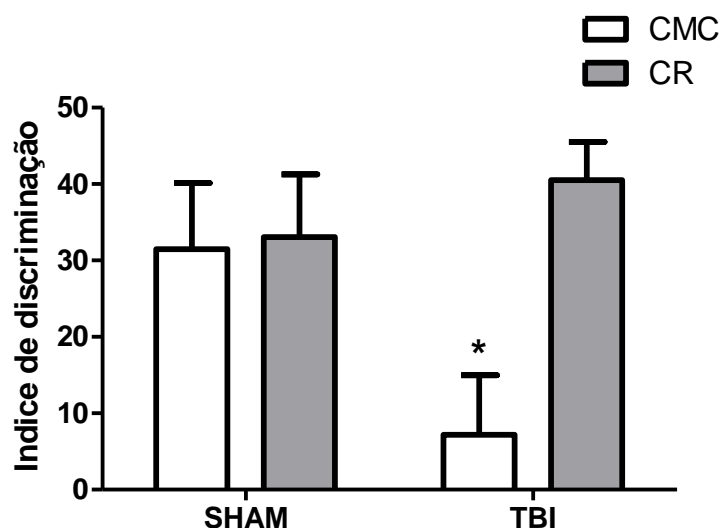
---

**RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

Dados da literatura revelam que o TCE é um dos principais problemas de saúde pública entre crianças e adolescentes, com elevadas taxas de incapacidade (CROWE et al., 2009). Uma das principais sequelas decorrentes dos processos primário e secundário desencadeados pelo TCE é o déficit cognitivo. Neste sentido avaliou-se a suplementação com creatina sobre o déficit cognitivo induzido pelo traumatismo cranioencefálico em ratos jovens.

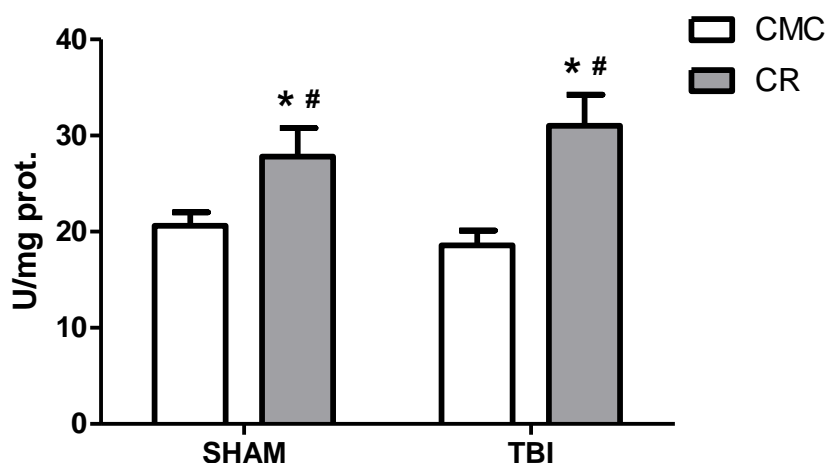
Quinze dias após o TCE, a análise estatística revelou que os animais que sofreram TCE apresentaram redução nas funções cognitivas na tarefa de reconhecimento de objeto ( $F(1,37)=5,612$   $p<0,05$ ), já os animais que foram suplementados com creatina reverteram este quadro ( $F(1,37)=4,639$   $p<0,05$ ), cabe salientar que a suplementação com creatina não apresenta efeito *per se*.



**Figura 14 – Efeito da suplementação com creatina sobre o déficit cognitivo** - Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.

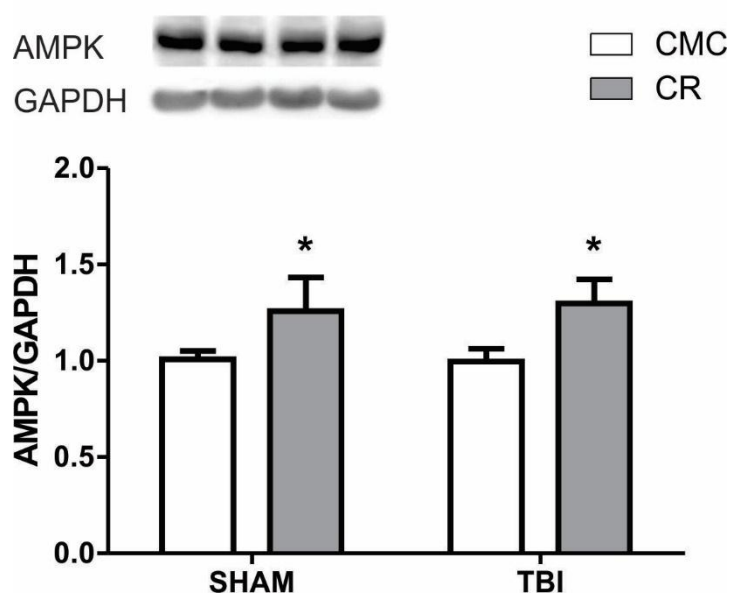
Na tentativa de elucidar o mecanismo no qual a suplementação com creatina protegeu do déficit cognitivo induzido pelo TCE, buscamos avaliar o envolvimento da enzima creatina quinase, uma enzima responsável pela conversão reversível de creatina em fosfocreatina, neste modelo experimental de TCE. Os resultados mostraram que o TCE não altera a atividade da enzima creatina quinase

( $F(1,20)=1,146$   $p>0,05$ ) quando analisado 15 dias após a injúria. Por outro lado, a suplementação com creatina aumenta a atividade da creatina quinase tanto nos animais que sofreram o TCE bem como nos animais que não sofreram ( $F(1,20)=16,40$   $p<0,05$ ).



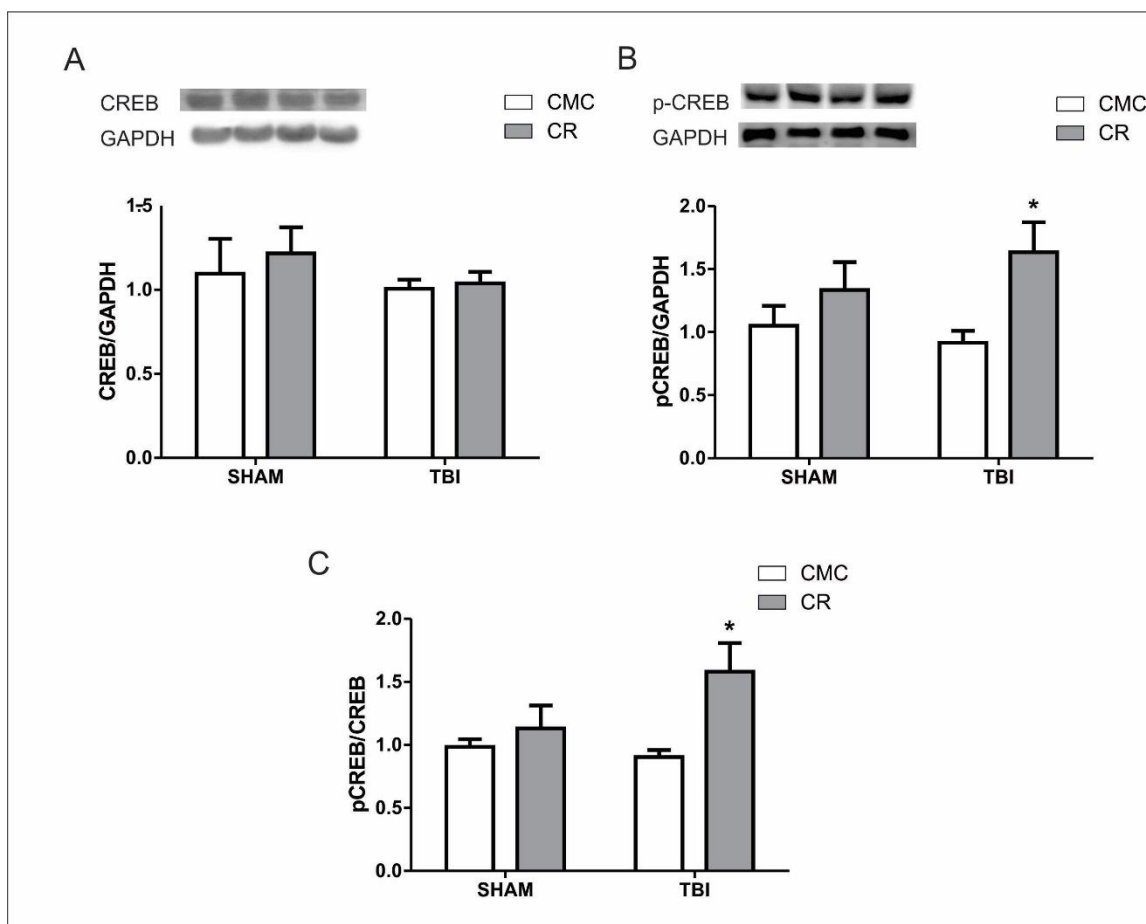
**Figura 15 – Efeito da suplementação com creatina sobre a atividade da enzima CK** - Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle, # =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo TBI + CMC.

No presente estudo, buscou-se também investigar o papel da TCE e da suplementação com creatina na expressão de proteínas envolvidas na memória como AMPK, CREB e BDNF. A análise estatística revelou que a o TCE não alterou a expressão de AMPK ( $F(1,11)=0,05345$   $p>0,05$ ). Entretanto, a suplementação de creatina aumentou a expressão de AMPK tanto nos animais que foram submetidos ao TCE quanto nos animais que não foram ( $F(1,11)=5,748$   $p<0,05$ ).



**Figura 16 – Efeito da suplementação com creatina na expressão de AMPK-** Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (*ANOVA*). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.

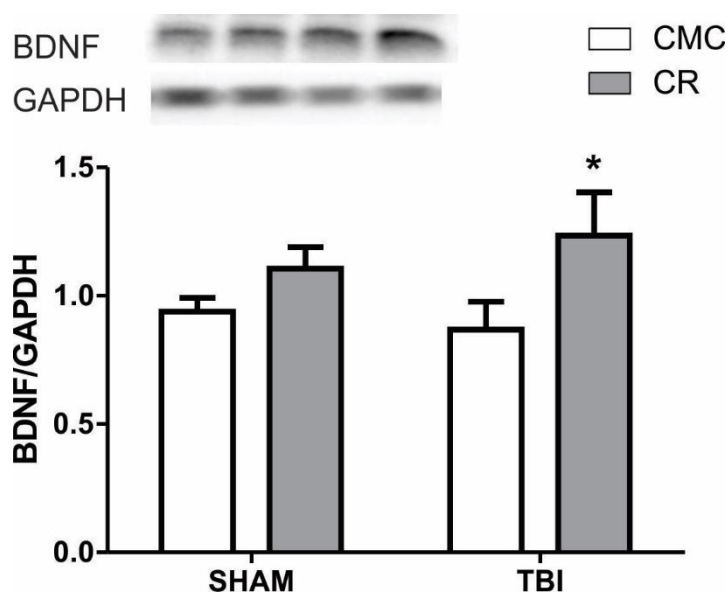
A análise estatística revelou que a o TCE não alterou a expressão de CREB ( $F(1,12)=0,1064$   $p>0,05$ ). Entretanto, a suplementação com creatina aumentou os níveis de p-CREB ( $F(1,12)=7,156$   $p<0,05$ ), bem como a razão entre p-CREB/CREB nos animais submetidos ao TCE( $F(1,12)=7,480$   $p<0,05$ ).



**Figura 17 – Efeito da suplementação com creatina sobre expressão de CREB e p-CREB**  
 – A) expressão de CREB, B) expressão de p-CREB, C) razão entre p-CREB/CREB. Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.

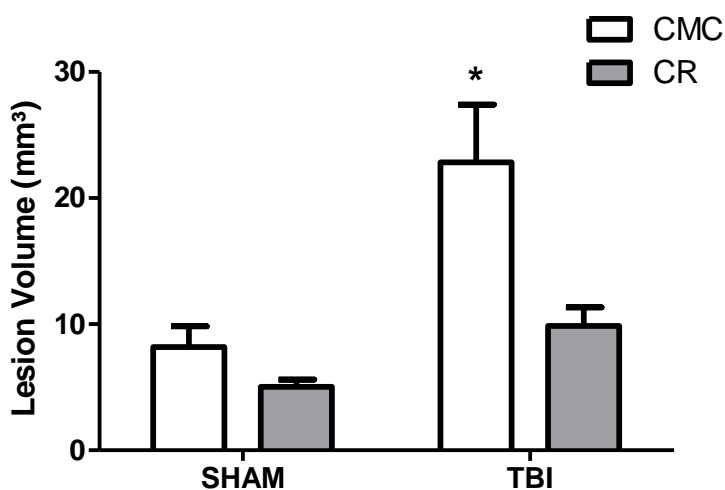
Considerando que p-CREB regula a transcrição do gene do BDNF e a presente proteína exerce um papel importante na potenciação de longa duração (LTP), na plasticidade sináptica e na sobrevivência de neurônios, verificamos o envolvimento desta proteína no efeito exercido pela creatina neste modelo de TCE. Nossos resultados demonstraram que o TCE não alterou a expressão de BDNF ( $F(1,8)=0,7929$   $p>0,05$ ). Entretanto a suplementação com creatina aumentou a expressão de BDNF somente nos animais submetidos ao TCE ( $F(1,8)=5,730$   $p<0,05$ ).



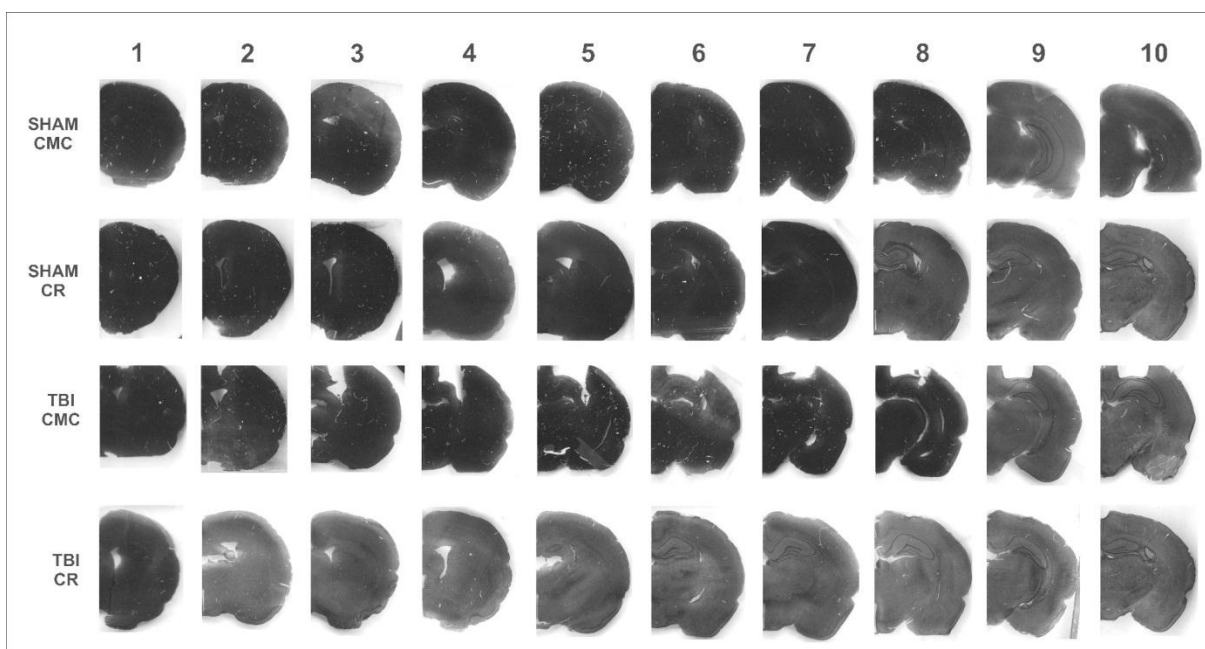


**Figura 18 – Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão de BDNF** - Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (*ANOVA*). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.

A partir disto resolvemos realizar a análise histológica dos cérebros. Os animais que foram submetidos ao TEC e não receberam a suplementação apresentaram um volume de leão elevado, enquanto os animais que receberam a suplementação retornaram aos níveis do controle ( $F(1,19)=13,48$   $p<0,05$ ) 15 dias após o TCE.



**Figura 19 – Efeito da suplementação com creatina sobre o Volume de Lesão** - Os dados representam a média e erro padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (*ANOVA*). A análise Post hoc foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.



**Figura 20 – Demonstrativo Volume de Lesão** – As fatias de 40  $\mu\text{m}$  estão numeradas de 1 a 10 e o espaçamento entre elas é de 500  $\mu\text{m}$ .

---

**DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

Traumatismo cranioencefálico tem sido chamado de "epidemia silenciosa" nos Estados Unidos nos últimos anos por causa de sua maior carga médica e financeira. O TCE afeta cerca de 1,7 milhões de pessoas anualmente e contribui para 30,5% de todas as mortes relacionadas a lesões em os EUA. Um subgrupo importante desta população são crianças e adolescentes na faixa etária de 0 a 14 anos, dos quais meio milhão já deu entrada no departamento de emergência para tratamento do de lesões relacionadas ao TCE (FAUL ET AL., 2010). Além disso, o TCE juvenil é a principal causa de morte e incapacidade em crianças e adolescentes (SCHNEIER et al., 2006). Outro fator importante é que as práticas esportivas e jovens sempre estiveram intimamente relacionadas. Neste sentido, chama-se a atenção traumas sofridos, principalmente por jovens durante pratica de esportes de contato como as artes marciais, o futebol americano, hóquei no gelo, baseball (HALSTEAD, 2010).

Estima-se que nos EUA cerca de 5,3 milhões de pessoas vivam com alguma sequela relacionada ao TCE (ROOZENBEEK, MAAS e MENON, 2013). Dentre estas sequelas destacamos o prejuízo cognitivo que pode ser caracterizado como qualquer retardo no pensamento ou na velocidade de resposta, confusão mental, falta de concentração, distração, desorganização, dificuldades de resolver problemas, déficit de aprendizagem e memória (BLAHA et al., 2015).

Devido a grande variedade de condições associadas ao TCE, há um considerável interesse no desenvolvimento e posterior aplicação de marcadores bioquímicos que relacionem a gravidade do dano cerebral com o desenvolvimento de problemas neurológicos, como déficits de memória e aprendizado. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo, no primeiro momento, verificar se o se os animais jovens submetidos ao TCE apresentavam déficit cognitivo quinze dias após a lesão e se a suplementação com creatina possui efeito protetor, alterando a atividade da enzima CK, modulando a expressão das proteínas AMPK, CREB, p-CREB e BDNF envolvidas no déficit cognitivo e no dano histológico gerado pelo TCE.

Nas ultimas décadas a creatina tem sido alvo de inúmeros estudos científicos, por exemplo, na década de 90 a suplementação com creatina ficou conhecida como um popular recurso para a melhora do desempenho desportivo (BALSOM,

SODERLUND e EKBLUM, 1994; GRAHAM e HATTON, 1999; KRAEMER e VOLEK, 1999; BENZI, 2000), posteriormente, ela tem sido usada pelo potencial neuroprotetor relacionado à doença de Parkinson (BENDER et al., 2006; HATTINGEN et al., 2009; HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010), Huntington (MATTHEWS et al., 1999; BENDER et al., 2005; YANG et al., 2009) e melhora da memória (SOUZA et al., 2012).

Como já é bem descrito na literatura que o déficit cognitivo é uma das principais sequelas presentes após o início da cascata de eventos neurodegenerativos desencadeada pelo TCE. O presente estudo evidenciou que os animais que foram submetidos ao TCE apresentaram uma redução nas funções cognitivas avaliadas pela tarefa de reconhecimento de objeto 15 dias após o TCE. Já os animais que receberam a suplementação com creatina não tiveram suas funções comprometidas. A partir desse resultado comportamental, questionou-se qual seria o modo pelo qual a suplementação com creatina poderia estar protegendo do déficit cognitivo neste modelo de TCE.

Nossos dados bioquímicos revelaram que a atividade da enzima creatina quinase estava aumentada quinze dias pós-trauma, corroborando a literatura que indica um fundamental papel da creatina na manutenção do *Buffer* energético, reciclando o ATP via ativação da presente enzima (SAKS, DZEJA, et al., 2006; SAKS, FAVIER, et al., 2006). A CK é um importante mediador da homeostase celular, uma vez que pode reversivelmente converter creatina em fosfocreatina. Desse modo, a referida enzima pode criar um conjunto de fosfocreatina que reestabelece de forma imediata o ATP intracelular. Segundo alguns trabalhos recentes, esse efeito da creatina está diretamente envolvido na melhora da memória temporal e espacial causada pela creatina (ADHIHETTY e BEAL, 2008; ANDRES et al., 2008).

Estudos também têm mostrado que a AMPK controla o metabolismo e o estado energético das células (HARDIE, CARLING e CARLSON, 1998; WINDER et al., 2000). Além disso, estudos demonstram que a atividade de AMPK é modulada por creatina e fosfocreatina de modo que uma redução na concentração destes compostos provoca a ativação de AMPK (PONTICOS et al., 1998). Neste sentido, as funções de AMPK no cérebro vêm sendo amplamente estudadas e incluem transporte de glicose neuronal, biogênese mitocondrial e regulação do

neurodesenvolvimento e viabilidade neuronal (AMATO e MAN, 2011a). A expressão de transportadores de glicose em neurônios é aumentada mediante insulto excitotóxico e esse fenômeno é regulado por AMPK (WEISOVA et al., 2009). Além de aumentar a captação de glicose, AMPK também melhora o funcionamento mitocondrial e biogênese. De fato, um estudo *in vitro* mostrou que o tratamento com ativadores de AMPK levavam ao aumento da expressão do mRNA de proteínas mitocondriais e fatores de transcrição, o que pode ser benéfico após uma lesão como o TCE (DASGUPTA e MILBRANDT, 2007; HALL, VAISHNAV e MUSTAFA, 2010).

Outros estudos mostram que tratamento com ativadores AMPK aumenta a sobrevivência neuronal em resposta a privação de glicose e outras formas de estresse celular (CULMSEE et al., 2001; WEISOVA et al., 2011). De fato, diversos estudos tem evidenciado um importante papel desta proteína em doenças neurodegenerativas tais como o Alzheimer e Doença de Huntington, uma vez que uma redução na expressão de AMPK altera o metabolismo neuronal e leva a um aumento na morte celular e a neurodegeneração (JU et al., 2011; SALMINEN e KAARNIRANTA, 2012). Nosso trabalho vem corroborar esses achados ao demonstrar que o tratamento com creatina, o qual é capaz de reduzir a lesão cerebral, também eleva o imunoconteúdo de AMPK.

Da mesma forma, os resultados protetores do tratamento com creatina sobre o déficit de memória vêm ao encontro de estudos realizados com ativadores de AMPK como metformina, que demonstram melhorar a memória de longo prazo em tarefas cognitivas em animais com restrição alimentar (DAGON et al., 2005; WANG et al., 2012), na tarefa de labirinto aquático de Morris (MWM) (KOBILLO, YUAN e VAN PRAAG, 2011). O tratamento crônico com metformina também demonstrou melhorar a memória espacial dos animais (ZOU et al., 2004; LEE et al., 2011). Há também evidências de que o tratamento a curto prazo após o insulto, pode melhorar os resultados a longo prazo, conforme demonstrado por HARADA, FUJITA-HAMABE e TOKUYAMA (2010) que o tratamento com metformina após isquemia teve uma redução no volume de lesão e melhorou as habilidades motoras

Ainda em relação a AMPK, nossos resultados também concordam com os achados de trabalhos realizados com TCE. Tais estudos mostram que a fosforilação de AMPK está diminuída no do terceiro ao sétimo dia após a lesão moderada (HILL

2012) e que o tratamento prévio com ativadores de AMPK reverte o déficit cognitivo e também aumentam a expressão de proteínas necessárias para a plasticidade sináptica (SHARMA et al., 2009). Entretanto, o presente trabalho é o primeiro a sugerir uma conexão entre CK e AMPK após o TCE, uma vez que a suplementação com creatina foi efetiva em elevar a atividade da CK ao mesmo tempo que elevou a expressão de AMPK.

O CREB, também é um substrato de AMPK e sua ativação depende da fosforilação por AMPK (HUANG et al., 2015). A PKA é responsável por regular a fosforilação/ativação de CREB. Outra via importante de ativação de CREB envolve a fosforilação/ativação de CREB via MAPK e AMPK (DELGHANDI, JOHANNESSEN e MOENS, 2005; AL-WADEI, TAKAHASHI e SCHULLER, 2006; MAIR et al., 2011). De fato, um estudo realizado em hipocampo de ratos demonstrou que a fosforilação de CREB foi altamente afetada na ausência de AMPK, resultando na regulação negativa do BDNF e conseqüentemente reduzindo a viabilidade celular (HUANG et al., 2015).

Outros estudos ainda indicam que em neurônios de hipocampo, o AMPK é muito importante na fosforilação de CREB, no entanto o efeito da regulação do AMPK sobre CREB envolve não apenas a fosforilação, mas também supressão mediada pós-transcricional SIRT1/miR-134. Assim, os neurônios do hipocampo são afetados pelo equilíbrio da supressão pós-transcricional e fosforilação/ativação e, quando na ausência da AMPK, este equilíbrio é desfeito, induzindo a desregulação dos genes de CREB e influenciando na viabilidade neuronal (HUANG et al., 2015).

Em nossos achados a creatina que aumentou a expressão de AMPK, também causou um aumento significativo na razão entre CREB e p-CREB nos animais que foram suplementados corroborando a existência de uma conexão AMPK e a fosforilação do CREB. No presente trabalho, também encontramos um aumento na expressão de BDNF nos animais que foram submetidos ao TCE e foram suplementados com este composto. Este resultado sugere que a creatina possui uma ação sobre CREB e BDNF via AMPK, que pode estar envolvida na proteção contra o déficit cognitivo gerado pelo TCE após quinze dias.

Para embasar tal conclusão é importante ressaltar que BDNF desempenha um importante papel tanto na aprendizagem e memória (CONNER et al., 1997; SQUIRE, 1992) quanto na neurogênese, plasticidade sináptica e sobrevivência

celular (HU e RUSSEK, 2008). Afirmação essa que pode ser confirmada em outros estudos em que se observa um aumento na expressão de BDNF após tarefas espaciais como MWM e labirinto radial (KESSLAK et al., 1998; MIZUNO et al., 2000) esquivas inibitórias (MA et al., 1998; ALONSO et al., 2002), medo condicionado (BREDY et al., 2007) e reconhecimento olfativo (BROAD et al., 2002).

Reforçam ainda mais essa premissa, os estudos que mostram que o LTP é significativamente reduzido em fatias de hipocampo de animais com alterações nos genes de BDNF (KORTE et al., 1995) e também em animais *knockout* para BDNF (PATTERSON et al., 1996). Além disso, alterações na sinalização de CREB-BDNF estão presentes em animais com déficit de memória induzido por radiação (OH et al., 2013).

Além dos efeitos do BDNF sobre a memória, a literatura ainda relata efeitos protetores sobre a morte celular por apoptose (XIA et al., 2013; XIA et al., 2014), bem como, um efeito restaurador sobre a viabilidade neuronal em modelos de toxicidade induzida pelos peptídeos  $A\beta_{1-42}$  e  $A\beta_{1-25}$  tanto *in vitro* quanto *in vivo*, (ARANCIBIA 2008). Considerando tais resultados, pode-se especular uma participação do BDNF na consolidação da memória, uma vez que a expressão desse peptídeo está aumentada nos animais que foram submetidos ao TCE e foram suplementados com creatina. O mesmo mecanismo pode também auxiliar na proteção evidenciada pela creatina no volume da lesão induzida pelo TCE.



---

**CONCLUSÃO**

## **8. CONCLUSÃO**

Mediante os resultados apresentados e os fatos mencionados é possível concluir nessa dissertação que os animais que foram submetidos ao TCE e não receberam a suplementação com creatina apresentaram uma redução na sua função cognitiva, já os que receberam creatina não tiveram prejuízo em suas funções. Concluímos também que a suplementação com creatina mantém a enzima CK ativa quinze dias pós TCE e que também aumenta a expressão da proteína AMPK no mesmo período, sugerindo que AMPK é um importante regulador metabólico envolvido na via CREB-BDNF onde a suplementação com creatina mantém aumentada a expressão destas proteínas apenas nos animais que sofreram o TCE. Destacamos também o importante papel da suplementação com creatina na proteção contra o aumento no volume de lesão quinze dias após o TCE.

---

## REFERÊNCIAS

## 9. REFERÊNCIAS

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

ADELSON, P. D.; KOCHANNEK, P. M. Head injury in children. **J Child Neurol**, v. 13, n. 1, p. 2-15, Jan 1998.

ADELSON, P. D. et al. The use of near infrared spectroscopy (NIRS) in children after traumatic brain injury: a preliminary report. **Acta Neurochir Suppl**, v. 71, p. 250-254, 1998.

ADHIHETTY, P. J.; BEAL, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. **Neuromolecular Med**, v. 10, n. 4, p. 275-290, 2008.

AL-WADEI, H. A.; TAKAHASHI, T.; SCHULLER, H. M. Growth stimulation of human pulmonary adenocarcinoma cells and small airway epithelial cells by beta-carotene via activation of cAMP, PKA, CREB and ERK1/2. **Int J Cancer**, v. 118, n. 6, p. 1370-1380, Mar 15 2006.

ALLOWAY, T. P. et al. The cognitive and behavioral characteristics of children with low working memory. **Child Dev**, v. 80, n. 2, p. 606-621, Mar-Apr 2009.

ALONSO, M. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 5-6, p. 663-674, Dec 2002.

AMATO, S.; MAN, H. Y. AMPK links cellular bioenergy status to the decision making of axon initiation in neurons. **Cell Logist**, v. 1, n. 3, p. 103-105, May 2011a.

\_\_\_\_\_. Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. **Cell Cycle**, v. 10, n. 20, p. 3452-3460, Oct 15 2011b.

ANDRES, R. H. et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull**, v. 76, n. 4, p. 329-343, Jul 1 2008.

ARBOGAST, K. B.; MARGULIES, S. S. A fiber-reinforced composite model of the viscoelastic behavior of the brainstem in shear. **J Biomech**, v. 32, n. 8, p. 865-870, Aug 1999.

BALSOM, P. D.; SODERLUND, K.; EKBLUM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. **Sports Med**, v. 18, n. 4, p. 268-280, Oct 1994.

- BASSIT, R. A.; CURI, R.; COSTA ROSA, L. F. Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 425-431, Aug 2008.
- BASSIT, R. A. et al. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 5, p. 945-955, Mar 2010.
- BEAR, M.F ; BARRY, W.C ; PARADISO, M.A **Neurociências: desvendando o sistema nervosa**. Artmed Editora S.A., 2006
- BENDER, A. et al. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. **J Neurol**, v. 252, n. 1, p. 36-41, Jan 2005.
- BENDER, A. et al. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. **Neurology**, v. 67, n. 7, p. 1262-1264, Oct 10 2006.
- BENZI, G. Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport? **Pharmacol Res**, v. 41, n. 3, p. 255-264, Mar 2000.
- BITTIGAU, P. et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. **Ann Neurol**, v. 45, n. 6, p. 724-735, Jun 1999.
- BLAHA, R. Z. et al. Factors influencing attrition in a multisite, randomized, clinical trial following traumatic brain injury in adolescence. **J Head Trauma Rehabil**, v. 30, n. 3, p. E33-40, May-Jun 2015.
- BOERO, J. et al. Restricted neuronal expression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase: changing patterns in development and with increased activity. **Mol Cell Biochem**, v. 244, n. 1-2, p. 69-76, Feb 2003.
- BOOTH, R. F.; PATEL, T. B.; CLARK, J. B. The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. **J Neurochem**, v. 34, n. 1, p. 17-25, Jan 1980.
- BOURTCHULADZE, R. et al. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. **Cell**, v. 79, n. 1, p. 59-68, Oct 7 1994.
- BRAISSANT, O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. **J Inherit Metab Dis**, v. 35, n. 4, p. 655-664, Jul 2012.
- BRAISSANT, O. et al. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 2, p. 423-433, Feb 2010.
- BRAISSANT, O. et al. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 86, n. 1-2, p. 193-201, Jan 31 2001.

- BRAMHAM, C. R. et al. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. **J Comp Neurol**, v. 368, n. 3, p. 371-382, May 6 1996.
- BREDY, T. W. et al. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learn Mem**, v. 14, n. 4, p. 268-276, Apr 2007.
- BREWER, G. J.; WALLIMANN, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. **J Neurochem**, v. 74, n. 5, p. 1968-1978, May 2000.
- BROAD, K. D. et al. Involvement of the medial prefrontal cortex in mediating behavioural responses to odour cues rather than olfactory recognition memory. **Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 715-729, 2002.
- BROOKS, S. P.; SUELTER, C. H. Association of chicken mitochondrial creatine kinase with the inner mitochondrial membrane. **Arch Biochem Biophys**, v. 253, n. 1, p. 122-132, Feb 15 1987.
- BRUNS, J., JR.; HAUSER, W. A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 10, p. 2-10, 2003.
- BRUSTOVETSKY, N.; BRUSTOVETSKY, T.; DUBINSKY, J. M. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. **J Neurochem**, v. 76, n. 2, p. 425-434, Jan 2001.
- BURLEIGH, S. A.; FARBER, R. S.; GILLARD, M. Community integration and life satisfaction after traumatic brain injury: long-term findings. **Am J Occup Ther**, v. 52, n. 1, p. 45-52, Jan 1998.
- CAMERON, P. A.; RAINER, T. H.; MAK, P. Motor vehicle deaths in Hong Kong: opportunities for improvement. **J Trauma**, v. 56, n. 4, p. 890-893, Apr 2004.
- CARVALHO LF; AFFONSECA C; GUERRA S; FERREIRA A; GOULART E. Traumatismo cranioencefálico grave em crianças e adolescentes. **Rev. bras. ter. intensiva** vol.19 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2007
- CASSIDY, J. D. et al. Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. **J Rehabil Med**, n. 43 Suppl, p. 28-60, Feb 2004.
- CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 299-309, Apr 2003.
- CHRIVIA, J. C. et al. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. **Nature**, v. 365, n. 6449, p. 855-859, Oct 28 1993.

CLARK, J. F. Creatine and phosphocreatine: a review of their use in exercise and sport. **J Athl Train**, v. 32, n. 1, p. 45-51, Jan 1997.

CONNER, J. M. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. **J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 2295-2313, Apr 1 1997.

CONTI, A. C. et al. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. **J Neurosci**, v. 18, n. 15, p. 5663-5672, Aug 1 1998.

COROMINAS, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. **Neuropsychobiology**, v. 55, n. 1, p. 2-13, 2007.

COURCHESNE, E. et al. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. **Radiology**, v. 216, n. 3, p. 672-682, Sep 2000.

CREMER, J. E.; BRAUN, L. D.; OLDENDORF, W. H. Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. **Biochim Biophys Acta**, v. 448, n. 4, p. 633-637, Nov 2 1976.

CROWE, L. et al. The epidemiology of paediatric head injuries: data from a referral centre in Victoria, Australia. **J Paediatr Child Health**, v. 45, n. 6, p. 346-350, Jun 2009.

CULMSEE, C. et al. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. **J Mol Neurosci**, v. 17, n. 1, p. 45-58, Aug 2001.

D'AMBROSIO, R. et al. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. **Brain**, v. 127, n. Pt 2, p. 304-314, Feb 2004.

DAGON, Y. et al. Nutritional status, cognition, and survival: a new role for leptin and AMP kinase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 51, p. 42142-42148, Dec 23 2005.

DAS, G. D. et al. Experimental studies on the postnatal development of the brain. II. Cytoarchitectural regeneration in the developing cerebellum of the rabbit. **TIT J Life Sci**, v. 3, n. 2, p. 29-65, 1973.

DASGUPTA, B.; MILBRANDT, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 17, p. 7217-7222, Apr 24 2007.

DELGHANDI, M. P.; JOHANNESSEN, M.; MOENS, U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. **Cell Signal**, v. 17, n. 11, p. 1343-1351, Nov 2005.

DEMANT, T. W.; RHODES, E. C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. **Sports Med**, v. 28, n. 1, p. 49-60, Jul 1999.

DEMINICE, R. et al. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. **Nutrition**, v. 29, n. 9, p. 1127-1132, Sep 2013.

DOS REIS, E. A. et al. Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model. **Metab Brain Dis**, v. 28, n. 3, p. 509-517, Sep 2013.

DUHAIME, A. C. et al. Maturation-dependent response of the piglet brain to scaled cortical impact. **J Neurosurg**, v. 93, n. 3, p. 455-462, Sep 2000.

ELOIA, Sara Cordeiro et al. Análise epidemiológica das hospitalizações por trauma cranioencefálico em um hospital de ensino. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 10, n. 2, 2013.

ENERSON, B. E.; DREWES, L. R. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 92, n. 8, p. 1531-1544, Aug 2003.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988.

FALAVIGNA, A. et al. Impact of an injury prevention program on teenagers' knowledge and attitudes: results of the Pense Bem-Caxias do Sul Project. **J Neurosurg Pediatr**, v. 9, n. 5, p. 562-568, May 2012.

FANN, J. R.; HART, T.; SCHOMER, K. G. Treatment for depression after traumatic brain injury: a systematic review. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 12, p. 2383-2402, Dec 2009.

FAUL M, Xu L, WALD MM, CORONADO VG Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations and deaths 2002–2006. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National center for Injury Prevention and Control, 2010.

FIGG, R. E.; BURRY, T. S.; VANDER KOLK, W. E. Clinical efficacy of serial computed tomographic scanning in severe closed head injury patients. **J Trauma**, v. 55, n. 6, p. 1061-1064, Dec 2003.

FILIP, M. et al. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. **Brain Res**, v. 1071, n. 1, p. 218-225, Feb 3 2006.

FINKBEINER, S. et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**, v. 19, n. 5, p. 1031-1047, Nov 1997.



- FERREIRA, A. A. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Rev Assoc Med** v. 55, p. 75-81, 2009.
- FLYNN, F. G. Memory impairment after mild traumatic brain injury. **Continuum (Minneapolis)**, v. 16, n. 6 Traumatic Brain Injury, p. 79-109, Dec 2010.
- GEFEN, A. et al. Age-dependent changes in material properties of the brain and braincase of the rat. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 11, p. 1163-1177, Nov 2003.
- GENNARELLI, T. A.; GRAHAM, D. I. Neuropathology. In: SILVER, J. M. (Ed.). **Textbook of traumatic brain injury**. Washington DC: American Psychiatric Publishing, Inc, v.1, 2005. p.27-50.
- GENIUS, J. et al. Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30554, 2012.
- GIORGIO, A. et al. Changes in white matter microstructure during adolescence. **Neuroimage**, v. 39, n. 1, p. 52-61, Jan 1 2008.
- GRAHAM, A. S.; HATTON, R. C. Creatine: a review of efficacy and safety. **J Am Pharm Assoc (Wash)**, v. 39, n. 6, p. 803-810; quiz 875-807, Nov-Dec 1999.
- GRANDE, P. O.; REINSTRUP, P.; ROMNER, B. Active cooling in traumatic brain-injured patients: a questionable therapy? **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 53, n. 10, p. 1233-1238, Nov 2009.
- GREENHAFF, P. L. Creatine supplementation: recent developments. **Br J Sports Med**, v. 30, n. 4, p. 276-277, Dec 1996.
- GRIMM, J. W. et al. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. **J Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 742-747, Feb 1 2003.
- HALL, E. D.; VAISHNAV, R. A.; MUSTAFA, A. G. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 51-61, Jan 2010.
- HALSTEAD, M. E. Contact sports for young athletes: keys to safety. **Pediatr Ann**, v. 39, n. 5, p. 275-278, May 2010.
- HARADA, S.; FUJITA-HAMABE, W.; TOKUYAMA, S. The importance of regulation of blood glucose levels through activation of peripheral 5'-AMP-activated protein kinase on ischemic neuronal damage. **Brain Res**, v. 1351, p. 254-263, Sep 10 2010.
- HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 1, p. 28-34, Jan 2004.
- \_\_\_\_\_. AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. **Cell Metab**, v. 6, n. 5, p. 339-340, Nov 2007.

\_\_\_\_\_. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. **Int J Obes (Lond)**, v. 32 Suppl 4, p. S7-12, Sep 2008.

HARDIE, D. G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 821-855, 1998.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 251-262, Apr 2012.

HATTINGEN, E. et al. Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. **Brain**, v. 132, n. Pt 12, p. 3285-3297, Dec 2009.

HAWKINS, R. A.; WILLIAMSON, D. H.; KREBS, H. A. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. **Biochem J**, v. 122, n. 1, p. 13-18, Mar 1971.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, Jul 2007.

HELENE, A. F., e XAVIER, G. F. Memória e (a elaboração da) percepção, imaginação, inconsciente e consciência. In J. Landeira-Fernandez & M. T. A. Silva (Orgs.), **Interseções entre psicologia e neurociências** (pp. 103-148). Rio de Janeiro: MedBook, 2007.

Hill, Julia L., "Exploring the Impact of Decreased AMPK Pathway Activity on Brain Injury Outcome". UT GSBS **Dissertations and Theses**, 2012.

HORGER, B. A. et al. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. **J Neurosci**, v. 19, n. 10, p. 4110-4122, May 15 1999.

HOSAMANI, R.; RAMESH, S. R.; MURALIDHARA. Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine. **Neurochem Res**, v. 35, n. 9, p. 1402-1412, Sep 2010.

HOVDA, D. A. (1996). In R. K. Narayan, J. E. Wilberger & J. T. Povlishock, ed. **Metabolic Dysfunction in Neurotrauma**, New York: McGraw-Hill Inc, pp. 1459–1478.

HOVDA, D. A., Le, H. M., Lifshitz, J. et al. (1994). Long-term changes in metabolic rates for glucose following mild, moderate and severe concussive head injuries in adult rats. **Journal of Neuroscience**, 20, 845.

HU, Y.; RUSSEK, S. J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. **J Neurochem**, v. 105, n. 1, p. 1-17, Apr 2008.

- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001.
- HUANG, W. et al. AMPK Plays a Dual Role in Regulation of CREB/BDNF Pathway in Mouse Primary Hippocampal Cells. **J Mol Neurosci**, Feb 3 2015.
- INOKI, K.; KIM, J.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 52, p. 381-400, 2012.
- IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-636, Jun 18 1998.
- IZQUIERDO, I. **memória** Artimed Editora, S.A., 2002.
- IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 1-11, Aug 1999.
- JANSEN, M. et al. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 777-798, Jul 2009.
- JENNETT, B. Epidemiology of head injury. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 362-369, Apr 1996.
- JU, T. C. et al. Nuclear translocation of AMPK- $\alpha$ 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. **J Cell Biol**, v. 194, n. 2, p. 209-227, Jul 25 2011.
- JURAVLEVA E, et al. Creatine prevents the cytotoxicity of haloperidol by alteration of NO/Ras/NF- $\kappa$ B system. In: Kekelidze T, Holtzman D, editors. Creatine kinase and brain energy metabolism: function and disease. NATO Science Series: **Life and Behavioral Science**. Amsterdam, IOS Press, V. 343, p. 113–119, 2003.
- KALDIS, P. et al. Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. **J Cell Sci**, v. 109 ( Pt 8), p. 2079-2088, Aug 1996.
- KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. **Mol Brain**, v. 5, p. 14, 2012.
- KANG, H.; SCHUMAN, E. M. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. **Science**, v. 273, n. 5280, p. 1402-1406, Sep 6 1996.
- KATAYAMA, Y. et al. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. **J Neurosurg**, v. 73, n. 6, p. 889-900, Dec 1990.

KAWAMATA, T. et al. Administration of excitatory amino acid antagonists via microdialysis attenuates the increase in glucose utilization seen following concussive brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 12, n. 1, p. 12-24, Jan 1992.

KESSLAK, J. P. et al. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? **Behav Neurosci**, v. 112, n. 4, p. 1012-1019, Aug 1998.

KHANNA, N. K.; MADAN, B. R. Studies on the anti-inflammatory activity of creatine. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 231, n. 2, p. 340-350, Feb 1978.

KHANNA, N. K.; TAHASHILDAR, J. Anti-inflammatory activity of creatine and indomethacin drug mixture in rats. **Indian J Exp Biol**, v. 23, n. 7, p. 402-403, Jul 1985.

KIDA, S. et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 4, p. 348-355, Apr 2002.

KLIVENYI, P. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **Nat Med**, v. 5, n. 3, p. 347-350, Mar 1999.

KOBILO, T.; YUAN, C.; VAN PRAAG, H. Endurance factors improve hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. **Learn Mem**, v. 18, n. 2, p. 103-107, Feb 2011.

KORGE, P.; BYRD, S. K.; CAMPBELL, K. B. Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca(2+)-ATPase. **Eur J Biochem**, v. 213, n. 3, p. 973-980, May 1 1993.

KORTE, M. et al. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 19, p. 8856-8860, Sep 12 1995.

KOSKINEN, S. Quality of life 10 years after a very severe traumatic brain injury (TBI): the perspective of the injured and the closest relative. **Brain Inj**, v. 12, n. 8, p. 631-648, Aug 1998.

KOTTKE, M.; WALLIMANN, T.; BRDICZKA, D. Dual electron microscopic localization of mitochondrial creatine kinase in brain mitochondria. **Biochem Med Metab Biol**, v. 51, n. 2, p. 105-117, Apr 1994.

KRAEMER, W. J.; VOLEK, J. S. Creatine supplementation. Its role in human performance. **Clin Sports Med**, v. 18, n. 3, p. 651-666, ix, Jul 1999.

KRAUS, J. F.; CHU, L. D. Epidemiology. In: SILVER, J. M.; MCALLISTER, T. W., et al (Ed.). **Textbook of traumatic brain injury**. Washington, DC London, England: American Psychiatric Publishing, 2005

- KRAUSE, S. M.; JACOBUS, W. E. Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. **J Biol Chem**, v. 267, n. 4, p. 2480-2486, Feb 5 1992.
- KUCZEWSKI, N. et al. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. **Mol Neurobiol**, v. 39, n. 1, p. 37-49, Feb 2009.
- LEE, J. O. et al. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 4, p. 974-981, Apr 2011.
- LEE, Y. S. et al. Transcriptional regulation of long-term memory in the marine snail *Aplysia*. **Mol Brain**, v. 1, p. 3, 2008.
- LEES, G. V.; JONES, E. G.; KANDEL, E. Expressive genes record memories. **Neurobiol Dis**, v. 7, n. 5, p. 533-536, Oct 2000.
- LEHMANN, H. Über die Umesterung des Adenylsauresystems mit Phosphagenen. **Ibid**, v. 286, p. 336-343, 1936.
- LELAND, K. M.; MCDONALD, T. L.; DRESCHER, K. M. Effect of creatine, creatinine, and creatine ethyl ester on TLR expression in macrophages. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 9, p. 1341-1347, Sep 2011.
- LEONG, S. F.; CLARK, J. B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. **Biochem J**, v. 218, n. 1, p. 131-138, Feb 15 1984.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios: **conceitos fundamentais de neurociência**. 2004, editora Abril, São Paulo.
- LEZAK, M. D.; HOWIESON, D. B.; LORING, D. W. **Neuropsychological assessment**. 4. ed. New York: Oxford University; 2004.
- LI, M. et al. Oxygen free radicals regulate energy metabolism via AMPK pathway following cerebral ischemia. **Neurol Res**, v. 32, n. 7, p. 779-784, Sep 2010.
- LING, G. S.; NEAL, C. J. Maintaining cerebral perfusion pressure is a worthy clinical goal. **Neurocrit Care**, v. 2, n. 1, p. 75-81, 2005.
- LIPSKAYA, T.; GEIGER, P. J.; BESSMAN, S. P. Compartmentation and metabolic parameters of mitochondrial hexokinase and creatine kinase depend on the rate of oxidative phosphorylation. **Biochem Mol Med**, v. 55, n. 2, p. 81-89, Aug 1995.
- LIPSKAYA, T. et al. Studies of the interaction of mitochondrial creatine kinase with the mitochondrial membrane. **Adv Myocardiol**, v. 3, p. 597-611, 1982.

LOBATO DE FARIA MT.. Abordagem multidisciplinar no acompanhamento de uma criança com Traumatismo *Crânio-Encefálico Análise Psicológica*, 2 (XXIV): 235-245, 2006.

LOHMAN, K. Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphosaure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. **Biochemische Zeitschrift**, v.271, p. 264-277, 1934

MA, Y. L. et al. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. **Neuroscience**, v. 82, n. 4, p. 957-967, Feb 1998.

MAIR, W. et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTG-1 and CREB. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 404-408, Feb 17 2011.

MATTHEWS, R. T. et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. **Exp Neurol**, v. 157, n. 1, p. 142-149, May 1999.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 11, p. 1637-1640, Nov 2010.

MERRILL, G. F. et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. E1107-1112, Dec 1997.

MESSAOUDI, E. et al. Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. **J Neurophysiol**, v. 79, n. 1, p. 496-499, Jan 1998.

MIZUNO, M. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. **J Neurosci**, v. 20, n. 18, p. 7116-7121, Sep 15 2000.

MORRIS, J. Cognitive rehabilitation: where we are and what is on the horizon. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 18, n. 1, p. 27-42, v-vi, Feb 2007.

MOWLA, S. J. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 12660-12666, Apr 20 2001.

NEHLIG, A.; BOYET, S.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A. Autoradiographic measurement of local cerebral beta-hydroxybutyrate uptake in the rat during postnatal development. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 871-878, 1991.

NEHLIG, A.; DE VASCONCELOS, A. P.; BOYET, S. Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. **J Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 2321-2333, Jul 1988.

NOLAN, T.; PENNY, M. Epidemiology of non-intentional injuries in an Australian urban region: results from injury surveillance. **J Paediatr Child Health**, v. 28, n. 1, p. 27-35, Feb 1992.

NOMURA, A. et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 4, p. 715-720, Jun 2003.

NORTH, S. H. et al. Rapid analytical methods for on-site triage for traumatic brain injury. **Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)**, v. 5, p. 35-56, 2012.

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

OH, S. B. et al. Baicalein attenuates impaired hippocampal neurogenesis and the neurocognitive deficits induced by gamma-ray radiation. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 2, p. 421-431, Jan 2013.

OLIVEIRA, R. A. et al. Glasgow outcome scale at hospital discharge as a prognostic index in patients with severe traumatic brain injury. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 8, p. 604-608, Aug 2012.

OSTEEN, C. L. et al. Age-dependency of <sup>45</sup>calcium accumulation following lateral fluid percussion: acute and delayed patterns. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 2, p. 141-162, Feb 2001.

PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, Jan 2013.

PATTERSON, S. L. et al. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. **Neuron**, v. 16, n. 6, p. 1137-1145, Jun 1996.

PAUS, T. et al. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. **Science**, v. 283, n. 5409, p. 1908-1911, Mar 19 1999.

PEHMOLLER, C. et al. Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 3, p. E665-675, Sep 2009.

PERGHER, G. K.; OLIVEIRA, R. G.; ÁVILA, L. M.; STEIN, L. M. Memória, humor e emoção. **Revista Psiquiatra**, Rio Grande do Sul, v. 28, p. 61-68, jan/abr 2006.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 161-176, Jun 2001.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A.; HOCHHAUS, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, n. 6, p. 557-574, 2003.

PERTSCH, M. et al. A histochemical study of the regional distribution in the rat brain of enzymatic activity hydrolyzing glucose- and 2-deoxyglucose-6-phosphate. **Histochemistry**, v. 88, n. 3-6, p. 257-262, 1988.

PIETA DIAS, C. et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1719-1725, Jun 8 2007.

PODELL, K. et al. Neuropsychological assessment in traumatic brain injury. **Psychiatr Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 855-876, Dec 2010.

PONTICOS, M. et al. Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. **EMBO J**, v. 17, n. 6, p. 1688-1699, Mar 16 1998.

POORTMANS, J. R. et al. Effect of short-term creatine supplementation on renal responses in men. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 76, n. 6, p. 566-567, 1997.

POORTMANS, J. R.; FRANCAUX, M. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? **Sports Med**, v. 30, n. 3, p. 155-170, Sep 2000.

POTTER, W. B. et al. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e8996, 2010.

PRANGE, M. T.; MARGULIES, S. S. Regional, directional, and age-dependent properties of the brain undergoing large deformation. **J Biomech Eng**, v. 124, n. 2, p. 244-252, Apr 2002.

PRINS, M. L. Cerebral ketone metabolism during development and injury. **Epilepsy Res**, v. 100, n. 3, p. 218-223, Jul 2012.

RIMEL, R. W. et al. Moderate head injury: completing the clinical spectrum of brain trauma. **Neurosurgery**, v. 11, n. 3, p. 344-351, Sep 1982.

ROOZENBEEK, B.; MAAS, A. I.; MENON, D. K. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 4, p. 231-236, Apr 2013.

RUY, Erika Lopes; DA ROSA, Maria Inês. Perfil epidemiológico de pacientes com traumatismo crânio encefálico. Epidemiological profile of patients with traumatic brain injury. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 40, n. 3, 2011

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

SAKS, V. et al. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. **J Physiol**, v. 571, n. Pt 2, p. 253-273, Mar 1 2006.



- SAKS, V. et al. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 769-777, Dec 15 2006.
- SAKS, V. A.; KHUCHUA, Z. A.; KUZNETSOV, A. V. Specific inhibition of ATP-ADP translocase in cardiac mitoplasts by antibodies against mitochondrial creatine kinase. **Biochim Biophys Acta**, v. 891, n. 2, p. 138-144, Apr 15 1987.
- SAKS, V. A. et al. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. **Mol Cell Biochem**, v. 133-134, p. 155-192, Apr-May 1994.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. **Ageing Res Rev**, v. 11, n. 2, p. 230-241, Apr 2012.
- SANTOS, R. V. et al. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30km race. **Life Sci**, v. 75, n. 16, p. 1917-1924, Sep 3 2004.
- SCHNEIER, A. J. et al. Incidence of pediatric traumatic brain injury and associated hospital resource utilization in the United States. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 483-492, Aug 2006.
- SCOTT, R. et al. CREB and the discovery of cognitive enhancers. **J Mol Neurosci**, v. 19, n. 1-2, p. 171-177, Aug-Oct 2002.
- SENATHI-RAJA, D.; PONSFORD, J.; SCHONBERGER, M. Impact of age on long-term cognitive function after traumatic brain injury. **Neuropsychology**, v. 24, n. 3, p. 336-344, May 2010.
- SESTILI, P. et al. Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 9, p. 1187-1204, Sep 2009.
- SHARMA, S. et al. Dietary curcumin supplementation counteracts reduction in levels of molecules involved in energy homeostasis after brain trauma. **Neuroscience**, v. 161, n. 4, p. 1037-1044, Jul 21 2009.
- SHENG, M.; THOMPSON, M. A.; GREENBERG, M. E. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. **Science**, v. 252, n. 5011, p. 1427-1430, Jun 7 1991.
- SILVA, A. J. et al. CREB and memory. **Annu Rev Neurosci**, v. 21, p. 127-148, 1998.
- SILVA, L. A. et al. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. **J Sports Sci**, v. 31, n. 11, p. 1164-1176, 2013.

SILVER M.J.; McALLISTER W.T; YUDOFKY C.S **Textbook traumatic brain injury**, 2005.

SOULE, J.; MESSAOUDI, E.; BRAMHAM, C. R. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 4, p. 600-604, Aug 2006.

SOUZA, M. A. et al. Involvement of hippocampal CAMKII/CREB signaling in the spatial memory retention induced by creatine. **Amino Acids**, v. 43, n. 6, p. 2491-2503, Dec 2012.

SPASIC, M. R.; CALLAERTS, P.; NORGA, K. K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. **Neuroscientist**, v. 15, n. 4, p. 309-316, Aug 2009.

SQUIRE L. R.; KANDEL, E.R. – **memória: da mente as moléculas**. Artmed Editora AS, Porto Alegre, 2003.

STOCKLER, S.; HANEFELD, F. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: a newly recognized inborn error of creatine biosynthesis. **Wien Klin Wochenschr**, v. 109, n. 3, p. 86-88, Feb 14 1997.

STOCKLER, S. et al. Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. **Metabolism**, v. 46, n. 10, p. 1189-1193, Oct 1997.

SUTER, M. et al. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 281, n. 43, p. 32207-32216, Oct 27 2006.

SUTTON, R. L. et al. Metabolic changes following cortical contusion: relationships to edema and morphological changes. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, v. 60, p. 446-448, 1994.

SUZUKI, A. et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **J Neurosci**, v. 31, n. 24, p. 8786-8802, Jun 15 2011.

TACHIKAWA, M. et al. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 144-160, Jul 2004.

TACHIKAWA, M. et al. A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. **Subcell Biochem**, v. 46, p. 83-98, 2007.

TAO, X. et al. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 709-726, Apr 1998.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-84, Jul 13 1974.

THOMAS, S. et al. Cerebral metabolic response to traumatic brain injury sustained early in development: a 2-deoxy-D-glucose autoradiographic study. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 8, p. 649-665, Aug 2000.

TURNLEY, A. M. et al. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. **J Neurochem**, v. 72, n. 4, p. 1707-1716, Apr 1999.

VAN DER KNAAP, M. S. et al. Mental retardation and behavioral problems as presenting signs of a creatine synthesis defect. **Ann Neurol**, v. 47, n. 4, p. 540-543, Apr 2000.

VAN PILSUM, J. F.; STEPHENS, G. C.; TAYLOR, D. Distribution of creatine, guanidinoacetate and the enzymes for their biosynthesis in the animal kingdom. Implications for phylogeny. **Biochem J**, v. 126, n. 2, p. 325-45, 1972.

VANNUCCI, S. J.; SIMPSON, I. A. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 5, p. E1127-1134, Nov 2003.

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 50, p. 177-242, 1979.

WALLIMANN, T.; HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. **Mol Cell Biochem**, v. 133-134, p. 193-220, Apr-May 1994.

WALLIMANN, T.; SCHLOSSER, T.; EPPENBERGER, H. M. Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle. **J Biol Chem**, v. 259, n. 8, p. 5238-5246, Apr 25 1984.

WANG, J. et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 1, p. 23-35, Jul 6 2012.

WEGMANN, G. et al. Differential expression and localization of brain-type and mitochondrial creatine kinase isoenzymes during development of the chicken retina: Mi-CK as a marker for differentiation of photoreceptor cells. **Differentiation**, v. 46, n. 2, p. 77-87, Mar 1991.

WEISOVA, P. et al. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. **J Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 2997-3008, Mar 4 2009.

- WEISOVA, P. et al. Role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in cell survival and death responses in neurons. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 10, p. 1863-1876, May 15 2011.
- WENGER, W. C. et al. Effects of ionic strength and sulfhydryl reagents on the binding of creatine phosphokinase to heart mitochondrial inner membranes. **J Bioenerg Biomembr**, v. 17, n. 5, p. 295-303, Oct 1985.
- WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth**, v. 99, n. 1, p. 4-9, Jul 2007.
- WINDER, W. W. et al. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 6, p. 2219-2226, Jun 2000.
- WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, Jul 2000.
- XIA, D. et al. RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. **Neoplasia**, v. 61, n. 5, p. 523-532, 2014.
- XIA, G. N. et al. Neural stem cells grafts decrease neural apoptosis associated with caspase-7 downregulation and BDNF upregulation in rats following spinal cord hemisection. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 7, p. 1013-1022, Oct 2013.
- YANG, C. C. et al. The association between the postconcussion symptoms and clinical outcomes for patients with mild traumatic brain injury. **J Trauma**, v. 62, n. 3, p. 657-663, Mar 2007.
- YANG, L. et al. Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. **J Neurochem**, v. 109, n. 5, p. 1427-1439, Jun 2009.
- YOSHINO, A. et al. Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. **Brain Res**, v. 561, n. 1, p. 106-119, Oct 4 1991.
- ZOU, M. H. et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. **J Biol Chem**, v. 279, n. 42, p. 43940-43951, Oct 15 2004.