



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

**ANÁLISE DO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE SOBRE A
SUSCEPTIBILIDADE A PENTILENOTETRAZOL E O EFEITO DO PRÉ-
TRATAMENTO COM CAFEÍNA EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luís Roberto Hart da Silva

**Santa Maria – RS, Brasil
2017**

ANÁLISE DO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE A PENTILENOTETRAZOL E O EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM CAFEÍNA EM RATOS

Luís Roberto Hart da Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria-RS, Brasil
2017

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

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

ANÁLISE DO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE SOBRE A
SUSCEPTIBILIDADE A PENTILENOTETRAZOL E O EFEITO DO PRÉ-
TRATAMENTO COM CAFEÍNA EM RATOS.

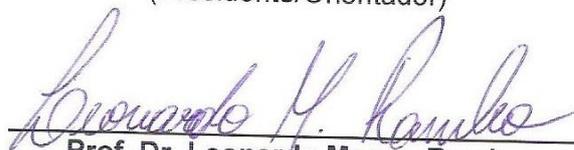
Elaborada por
Luís Roberto Hart da Silva

Como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

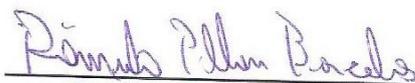
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Leonardo Magno Rambo
(Examinador)



Prof. Dr. Rômulo Pillon Barcelos
(Examinador)

Santa Maria-RS, Setembro de 2017.

Esta dissertação é dedicada à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, por estar sempre presente em cada escolha que faço e que sempre me apoiaram nesta caminhada.

Agradeço ao professor Luiz Fernando e a Michele por esta oportunidade e orientação.

Agradeço ao meu amigo Gustavo, o qual foi o braço direito deste trabalho e aos demais colegas do Bioex e Labneuro que me ajudaram de alguma forma na minha formação e principalmente pela amizade. Muito Obrigado!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

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

ANÁLISE DO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE A PENTILENOTETRAZOL E O EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM CAFEÍNA EM RATOS

AUTOR: Luís Roberto Hart da Silva

ORIENTADOR: Luiz Fernando Freire Royes

Data e Local da Defesa: Santa Maria, Setembro de 2017.

O traumatismo cranioencefálico (TCE) constitui um problema de saúde pública, com alta incidência, debilitação e fatalidade na sociedade moderna, resultando frequentemente em disfunções neurológicas. Tem sido demonstrado que essas anormalidades após o TCE promovem um aumento na excitabilidade neuronal, assim como convulsões espontâneas e epilepsia pós-traumática (EPT). Considerando que os pacientes com o surgimento precoce de convulsões podem ter maior risco de epilepsia tardia, faz-se grande importância de estudos em uma janela de curto prazo. Além disso, sabe-se que existe uma relação direta entre os níveis de estresse oxidativo e as patologias decorrentes do TCE, e o uso de compostos antioxidantes podem auxiliar neste quadro. Neste contexto, a cafeína, uma droga com um potencial antioxidante já bem descrita na literatura, porém, com poucos estudos associados com o TCE. Esse trabalho teve como objetivo investigar se o TCE leve aumentaria a susceptibilidade ao aparecimento de convulsões em uma janela de tempo inicial após o TCE e se o consumo crônico prévio da cafeína poderia exercer alguma proteção inicial após a lesão. Para isso foram utilizados ratos wistar machos, divididos em quatro grupos: sham água, sham cafeína, TCE água e TCE cafeína, os grupos cafeína receberam um pré-tratamento subcrônico de cafeína por quinze dias. Após este processo, os animais foram submetidos ao TCE através do modelo de percussão de fluido. Sendo realizados registros eletroencefalográficos (EEG) e teste com pentilenotetrazol (PTZ), assim como marcadores de estresse oxidativo, como 4-HNE, GSH/GSSG, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT). Com esse estudo pode-se concluir que o TCE leve em um único caso não é capaz de influenciar no surgimento de convulsões pós-traumáticas quatro dias após a lesão, no entanto, promove algumas mudanças eletroencefalográficas, principalmente no tipo de onda. E o consumo prévio de cafeína mostrou uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica 24 horas após a lesão, mostrando que o consumo crônico de um composto antioxidante pode auxiliar na recuperação. Além disso, esse estudo ajudou a compreender um pouco mais sobre as mudanças que o TCE leve promove, ajudando na busca de novas estratégias terapêuticas.

Palavras Chaves: TCE leve, EPT, EEG, cafeína, status-antioxidante.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduating Program in Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANALYSIS OF TRAUMATIC BRAINS INJURY MILD ON SUSCEPTIBILITY OF PENTILENOTETRAZOL AND THE EFFECT OF PRE-TREATMENT WITH CAFFEINE IN RATS

AUTHOR: Luís Roberto Hart da Silva

ADVISOR: Luiz Fernando Freire Royes

Date and Place: Santa Maria, September, 2017.

Traumatic Brain Injury (TBI) is a public health problem, with a high incidence, debilitation and fatality in modern society, often resulting in neurological dysfunctions. These abnormalities after TBI have been shown to promote increased neuronal excitability, as well as spontaneous seizures and posttraumatic epilepsy (EPT). Considering that patients with the onset of seizures may be at increased risk of late epilepsy, it is important to study in a short-term window. The vast majority of these studies involve severe TBI, and little is known about lesions considered to be mild, 70-90% of which are clinical cases. In addition, it is known that there is a direct relationship between the levels of oxidative stress and the pathogens resulting from TBI, and the use of antioxidant compounds may help in this situation. In this context, caffeine, a drug with an antioxidant potential already well described in the literature, but with few studies together with the TBI. This study aimed to investigate whether mild TBI would increase the susceptibility to seizures in an initial time window after the TBI and whether the previous consumption of caffeine could exert some initial protection after the injury. Male wistar rats were divided into four groups: sham saline, sham caffeine, TBI saline and TBI caffeine, caffeine groups received a subchronic pretreatment of caffeine for fifteen days. After this process, the animals were submitted to TCE using the fluid percussion model. Electroencephalographic (EEG) and pentylenetetrazole (PTZ) tests were performed, as well as oxidative stress markers such as 4-HNE, GSH / GSSG, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT). With this study it can be concluded that mild TBI in a single case is not able to influence any surgeon of posttraumatic seizures four days after an injury, however, it promotes a few electroencephalographic changes, mainly in the wave type. And the previous consumption of caffeine showed a decrease in the levels of lipid peroxidation 24 hours after an injury, showing that the chronic consumption of an antioxidant compound can aid in recovery. In addition, this study explains a bit more about the changes regarding mild TBI promotes, helping in the search for new therapeutic strategies.

Keywords – Fluid percussion injury, Mild TBI, EPT, EEG, caffeine, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Tabela 1	Escala de coma de Glasgow	16
Figura 1	Modelos Experimentais do TCE	19
Figura 2	Tipos de Onda - EEG	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-Hidroxinonenal
AMPC	Adenosina-monofosfato-cíclico
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
ECG	Escala de Coma de Glasgow
EEG	Eletroencefalografia/ Eletroencefalograma
ERNs	Espécies Reativas ao Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas a Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FNM	Mononucleotídeo de Flavina
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona Transferase
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
Nrf2	Fator Nuclear Relacionado ao Eritróide-2
ON	Óxido Nítrico
PTE	Epilepsia Pós-traumática
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TC	Tomografia Computadorizada
TCE	Traumatismo Cranioencefálico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO.....	13
1.1.1. Definição e quadro epidemiológico.....	13
1.1.2. Classificação do TCE.....	15
1.1.2.1. Classificação quanto à gravidade da lesão.....	15
1.1.2.2. Classificação quanto ao mecanismo da lesão.....	17
1.1.2.3. Classificação quanto à distribuição das lesões.....	17
1.1.2.4. Classificação quanto à progressão das lesões.....	18
1.1.3. Modelos experimentais de TCE.....	18
1.1.4. Disfunções relacionadas ao TCE.....	20
1.2. EPILEPSIA.....	20
1.2.1. Definição.....	20
1.2.2. Eletroencefalografia (EEG).....	21
1.2.3. Modelos experimentais de epilepsias e convulsões.....	24
1.3. TCE e ESTRESS OXIDATIVO.....	25
1.4. CAFEÍNA.....	27
1.4.1 Metabolismo.....	28
1.4.2 Mecanismo de ação da Cafeína.....	29
1.5 JUSTIFICATIVA.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

APRESENTAÇÃO

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

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

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

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se a toda esta dissertação, sendo esta separada em duas partes: referências utilizadas no artigo científico e referências utilizadas na dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)

1.1.1. Definição e quadro epidemiológico

Por definição, o TCE é “uma agressão ao cérebro, de natureza não degenerativa e não congênita causada por uma força física externa, que pode produzir um estado diminuído ou alterado de consciência” (UMPHRED, 1994), sendo uma das causas mais frequentes de lesão encefálica e de morte no adulto jovem, considera um problema de saúde em ascensão, tendo em vista a ocorrência de grande número de acidentes automotores e dos crescentes índices de violência urbana (ARREOLA-RISA et al., 1995). Estes déficits e incapacidades temporárias e permanentes podem desabilitar o indivíduo lesionado pelo TCE de suas capacidades diárias (SILVER, 2005; ATKINS et al., 2009), além de causar distúrbios emocionais ou comportamentais (SMITH, 1994). Nos últimos anos, o TCE alcançou o patamar de epidemia mundial e vem sendo associado a altos índices de morbidade e mortalidade, além de trazer consigo esses expressivos impactos socioeconômicos (ZITNAY, 2005).

Dados históricos já destacavam o TCE como sendo um importante fator de óbito em suas vítimas, tomando proporções cada vez maiores, até atingir os atuais índices de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial de Saúde revela o óbito de 5 milhões de pessoas em decorrência de TCE anualmente, o que representa 9% de todos os falecimentos mundiais ocorridos em um ano (WHO, 2009). De acordo com um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos da América (EUA) em 1990, a incidência de TCE foi estimada em 500 mil por ano na população de 250 milhões de habitantes naquele período, onde a taxa de mortalidade nos TCE chegou ao índice de 50 mil casos por ano, em torno de 10%, com o mesmo índice referente à morbidade, da inabilidade à dependência total. A causa principal foi o acidente automobilístico, em torno de 50%, onde quando associado com a ingestão de bebida alcoólica chegou a 72%, ressaltando-se, portanto, a combinação de ambos. Outras causas também foram relacionadas a acidentes envolvendo veículos de duas rodas,

motos e bicicletas, quedas de alturas, agressões, acidentes nos esportes e nas indústrias (GUIAS DE MEDICINA AMBULATORIAL E HOSPITALAR, 2005).

Atualmente, o TCE é a maior causa de mortalidade nas comunidades, sendo considerado um grande problema de saúde pública nos EUA, onde a estimativa é de que 1,5 a 8 milhões de pessoas sobreviventes de TCE vivam em estado alterado de condição física e/ou cognitiva (SIGNORETTI et al., 2011). Neste mesmo país, a incidência de TCE foi estimada em 1,7 milhões de casos por ano, levando a casos de morte de aproximadamente 52 mil pessoas, 275 mil hospitalizações e em torno de 1,4 milhões que foram tratados e liberados de um serviço de emergência (FAUL, 2010). Esses dados norte-americanos mostram uma maior incidência de TCE em indivíduos masculinos na faixa etária de 14 a 24 anos de idade e de pessoas na senescência, próximo a 64 anos de idade (SILVER, 2005). Estudos recentes mostram que as principais causas de TCE nos EUA se diferenciam do quadro estimado no período anterior, onde, as quedas (35%) estão na frente de acidentes automobilísticos (17%), logo atrás estão os acidentes de trabalho e práticas esportivas (16,5%), assaltos (10%), seguido de fatores desconhecidos (21%) (FAUL, 2010).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos relacionados ao TCE. Sendo esses, em sua maioria, separados por regiões, o que os tornam menos compreensivos. Apesar disto, estima-se que 74% dos TCE estejam relacionados a acidentes de trânsito, onde os maiores envolvidos são adultos jovens com idade média de 34 anos, levando a casos de morbidade para aqueles que dele sobrevivem (OLIVEIRA et al., 2012). Os autores sugerem que os dados de mortalidade sejam expressivos devido a um trânsito mais conturbado, uso de álcool associado à direção, falta de padronização no atendimento do traumatizado, demora no socorro efetivo, manuseio da vítima e falta de recursos financeiros.

Em geral, 30% das mortalidades estão relacionadas à hipóxia cerebral, que ocorre frequentemente desde o momento do acidente até a chegada ao hospital. O choque hipovolêmico determina o índice de 28% de mortalidade. O bom atendimento no local do acidente reduz o índice de mortalidade em 20% nos acidentes automobilísticos (GUIAS DE MEDICINA AMBULATORIAL E HOSPITALAR, 2005).

Em um dos poucos trabalhos do âmbito nacional, realizado pela Universidade Federal da Bahia, foi constatado que o número de internações hospitalares em decorrência do TCE no Sistema Único de Saúde Brasileiro se concentra na região sudeste (43%) do Brasil, entre os indivíduos do sexo masculino (81,5%), na faixa etária de 14 – 35 anos (53%) (FERNANDES, 2010). De uma forma global, o panorama epidemiológico mostra que cerca de 10 milhões de pessoas sofrem um novo episódio de TCE todos os anos e que cerca de 5,3 milhões de pessoas vivem com sequelas causadas pela lesão, o que custou no ano 2000, cerca de US\$ 406 bilhões em custos diretos e indiretos no mundo (FEIGIN et al., 2013). Dentre todos estes dados relacionados ao TCE, estudos epidemiológicos que tragam estimativas completas de lesões cerebrais são essenciais para orientar a prevenção, identificar as melhores práticas terapêuticas e planejar futuros tratamentos que tenham menores custos e sejam mais efetivos (BARKER-COLLO e FEIGIN, 2009).

1.1.2. Classificação do TCE

O traumatismo pode ser classificado em leve, moderado ou grave, podendo ser do tipo fechado ou penetrante oriundo de um impacto por contato ou movimento de aceleração/desaceleração (teoria da deformação do crânio e da rotação ou aceleração da cabeça de Holbourn). Dentre as lesões estão as focais e as difusas e a progressão da lesão cerebral é classificada de forma primária e secundária.

1.1.2.1. Classificação quanto à gravidade da lesão

Em 1979, Teasdale e Jennet descreveram a Escala de Coma de Glasgow (ECG), como sendo um índice de gravidade de lesão após o TCE. Cabe salientar que a presente escala é usada em serviços de neurocirurgia atualmente. Esta escala permite por meio de graduação, uma avaliação do estado neurológico do paciente que sofreu um TCE, classificando-o em leve, moderado ou grave. Essa escala atribui escores para sinais clínicos como abertura dos olhos, resposta motora e resposta verbal. A soma dos escores é, então, utilizada para categorizar os pacientes. Para classificar o TCE em um grau leve, o paciente deverá responder a escala e produzir um escore entre 13-15. O TCE é moderado quando o paciente apresenta um escore de 9-12 e o TCE é classificado como grave quando a avaliação na escala permanece menor que 8.

Escala de coma de Glasgow

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



TABELA 1 - Escala de coma de Glasgow – Tabela usada para avaliar, em humanos a gravidade do trauma na chegada em unidade de saúde.

Do ponto de vista clínico, o trauma leve corresponde ao que se chama de comoção ou concussão, em que o paciente pode perder a consciência por um breve período, no máximo 30 minutos, e com recuperação completa do estado neurológico. Esses pacientes às vezes apresentam alteração temporária neurovegetativa incluindo vômitos, cefaléia, sudorese e mal-estar em geral. Se a perda de consciência perdurar por um período maior que 30 minutos após a lesão, e que outras características não se enquadrem em trauma grave, pode-se classificar o TCE de grau moderado. No TCE grave, a perda de consciência ocorre por um período maior que 24 horas (FREY, 2003). Neste quadro o paciente apresenta-se mal, com alterações autonômicas e respiratórias, podendo entrar em estado de

rigidez de descerebração ou decorticação, sudorese abundante e alterações pressóricas (grau 4 na ECG).

Vários métodos têm sido utilizados ao longo das últimas décadas para avaliar o grau do dano cerebral, incluindo uma proposta mais recente para classificar a lesão cerebral usando tomografia computadorizada (TC) (GUIAS DE MEDICINA AMBULATORIAL E HOSPITALAR, 2005).

1.1.2.2. Classificação quanto ao mecanismo da lesão

Este tipo de classificação permite entender como forças específicas, em magnitudes específicas, agem sobre o dano cerebral. Desta forma, é possível prever quais padrões de lesões provavelmente resultarão do TCE (SAATMAN et al., 2008). Neste contexto, dois principais tipos de impactos cerebrais foram classificados, o impacto por contato e o impacto por aceleração/desaceleração (NORTJE e MENON, 2004).

O impacto por contato se caracteriza quando algum objeto entra em contato com o crânio, ou o crânio colide com algum objeto (SAATMAN et al., 2008). Este tipo de impacto frequentemente associa-se a quedas e perfurações, podendo ocorrer fratura, afundamento de crânio, contusão e laceração (GENNARELLI, 2005). Já no impacto de aceleração/desaceleração ocorre um movimento inercial do encéfalo em relação ao crânio, onde a lesão não necessariamente é causada por algum contato externo. As lesões derivadas do impacto por aceleração/desaceleração geralmente são características de acidentes automobilísticos e quedas de grandes alturas (GENNARELLI, 2005).

1.1.2.3. Classificação quanto à distribuição das lesões

A análise clínica e neuroradiológica das lesões possibilita a classificação do TCE em focais e difusas. A lesão focal é frequentemente produzida por um impacto por contato, e são associadas à contusão cerebral, hemorragia, infarto do tronco encefálico, lacerações, fratura de crânio, hematoma intracraniano, hematoma extradural, e extensiva morte celular local principalmente por necrose (GENNARELLI, 2005; ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010). Já a lesão difusa é associada ao impacto por aceleração/desaceleração (GENNARELLI, 2005). São

características deste tipo de lesão a lesão axonal difusa, lesão cerebral hipóxica, tumefação cerebral difusa e lesão vascular focal múltipla. Embora apresentem características patofisiológicas diferentes, ambos os tipos de lesões podem causar déficits cognitivos e motores. (ANDRIESSEN, JACOBS e VOS, 2010)

1.1.2.4. Classificação quanto à progressão das lesões

Outro tipo de classificação das lesões associadas ao TCE ocorre em relação ao momento do impacto até danos posteriores, sendo divididas em dano primário e dano secundário. A lesão primária consiste basicamente no dano mecânico imediato provocado no momento do impacto e incluem as fraturas ósseas, danos axonais, meníngeos, vasculares e morte celular imediata (SAATMAN et al., 2008). O dano primário é irreversível, porém pode-se evitar ou diminuir os danos causados pelo impacto ao crânio com o uso de cinto de segurança, air-bag, capacete, educação no trânsito e combate a violência.

Em consequência do dano primário, inicia-se uma cascata de eventos moleculares e celulares que é denominado de dano secundário, 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).

1.1.3. Modelos experimentais de TCE

Estudos pré-clínicos através de modelos experimentais de TCE em roedores são de grande importância para o seu estudo, pois produzem muitas características que mimetizam a condição humana e fornecem informações válidas para o desenvolvimento de novos tratamentos e condutas para essa condição clínica. Para estes fins, muitos modelos experimentais de TCE são amplamente utilizados atualmente, dentre eles podemos destacar:

a) Impacto cortical controlado (ICC), esse modelo utiliza um dispositivo de impacto pneumático ou eletromagnético para dirigir um pêndulo rígido sobre a dura-máter

(membrana cerebral mais externa) causando lesão predominantemente focal. **b)** Lesão em cabeça fechada (**LCF**), conhecido em inglês como “*close head injury*” ou “*weight-drop*”, onde um projétil em queda livre atinge o crânio exposto com ou sem craniectomia resultando em uma lesão com característica mais difusa por ação de forças inerciais. **c)** Onda mecânica de explosão (**OME**), esse modelo não envolve impacto direto sobre o crânio, a lesão ocorre através das ondas de choque que se propagam sobre os tecidos cerebrais expostos a uma explosão, mimetizando o conflito de militares em zona de combate. **d)** Percussão de fluido (**PF**) envolve a trepanação craniana (linha média, sagital ou lateral) para a realização da craniectomia onde um jato de fluido em alta velocidade promoverá a lesão sobre a dura-máter do animal. Adaptado de (XIONG, MAHMOOD e CHOPP, 2013).

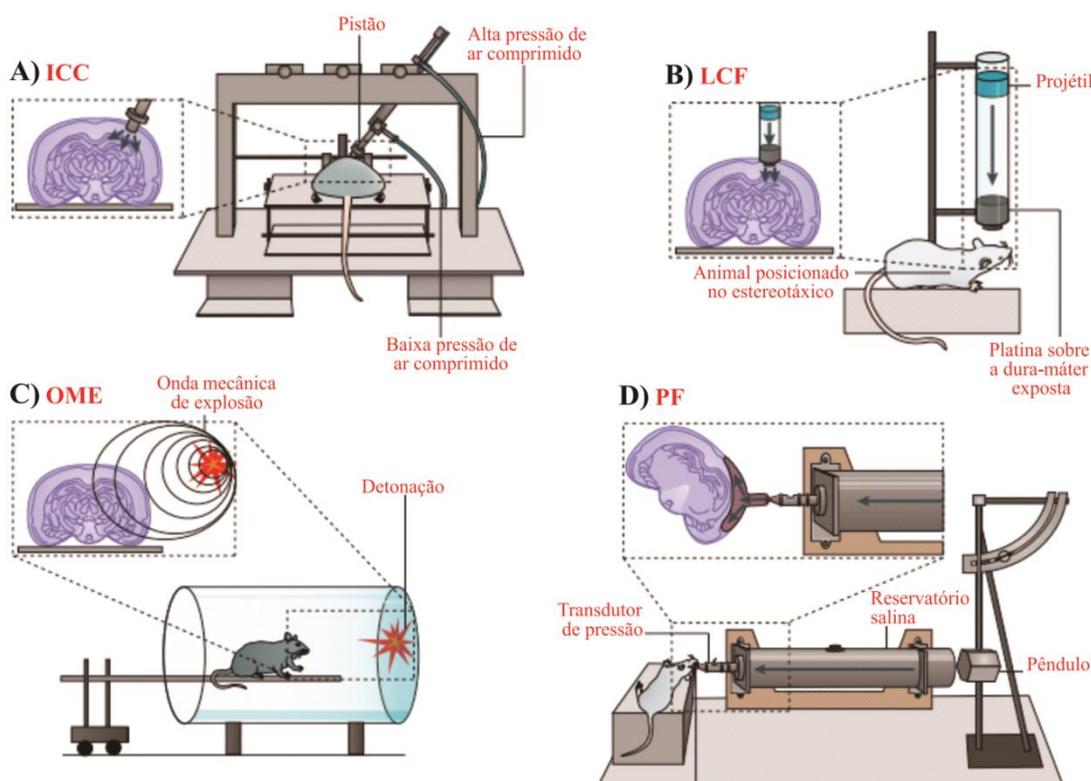


Figura 1. Modelos experimentais para o estudo do TCE. **a)** Impacto cortical controlado (**ICC**); **b)** Lesão em cabeça fechada (**LCF**); **c)** Onda mecânica de explosão (**OME**); **d)** Percussão de fluido (**PF**).
 Fonte: Adaptado de (XIONG, MAHMOOD e CHOPP, 2013).

Dentre os quatros modelos acima mencionados, o modelo de PF produz alterações fisiológicas, histológicas e comportamentais (déficit cognitivo e motor) bem documentadas em roedores, mimetizando as condições comumente observadas em pacientes com TCE, o que torna esse modelo um dos mais clinicamente relevantes (THOMPSON, SEBASTIANELLI e SLOBOUNOV, 2005).

1.1.4. Disfunções relacionadas ao TCE

A cada ano o TCE contribui para um número substancial de mortes e casos de incapacidades permanentes. Grande parte dos sobreviventes do TCE apresenta distúrbios neurológicos que os afetam em muitas de suas atividades diárias prejudicando a qualidade de vida destes sujeitos (SILVER, 2005; FAUL, 2010). Neste contexto, o TCE resulta em uma variedade de distúrbios motores e neuropsiquiátricos que vão desde déficits leves a graves distúrbios emocionais e intelectuais, incluindo déficits motores, déficits cognitivos, declínio emocional e epilepsia (PITKANEN e MCINTOSH, 2006).

1.2. EPILEPSIA

1.2.1. Definição

A epilepsia é uma doença do cérebro com: (1) pelo menos duas convulsões não provocadas ocorrendo com um intervalo de pelo menos 24h de distância; (2) uma convulsão não provocada e uma probabilidade de convulsões adicionais semelhantes ao risco de recorrência geral (pelo menos 60%) após duas convulsões não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos; (3) diagnóstico de síndrome de epilepsia (FISHER, 2015). Sendo as convulsões caracterizadas como a manifestação motora das crises.

A epilepsia representa uma doença heterogênea que tem diversas etiologias, padrões eletrofisiológicos e comportamentais. Como tal, a sua patogenia é multifatorial, pois qualquer perturbação neurológica, lesional ou funcional é susceptível de desencadear o aparecimento de convulsões. Pode ter um componente genético, pode ser desencadeada por alterações desconhecidas na atividade neural, por alterações na neurotransmissão ou ainda por estímulos

ambientais que não causam ataques em cérebros normais (PODELL, 1995; GOODKIN e KAPUR, 2003).

A epilepsia afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo (STRINE et al., 2005). A cada ano somam-se aproximadamente dois milhões de casos, sendo que esta condição acomete pessoas de todas as raças, sexos e condições socioeconômicas. Estima-se que 80% das pessoas com epilepsia vivam em países em desenvolvimento, onde 60-90% destas não recebem nenhum tipo de tratamento (SANDER e SHORVON, 1996; MEINARDI et al., 2001; REYNOLDS, 2002).

A epilepsia que se desenvolve após o TCE representa um dos alvos mais visíveis e atraentes para o projeto de estratégias de tratamento antiepiléptico. O insulto cerebral original é identificável e o intervalo entre o TCE e a apresentação clínica da primeira convocação abrange de meses a anos (KHARATISHVILI e PITKANEN, 2010). Durante o período latente, numerosas anormalidades se desenvolvem em resposta a lesões, incluindo alterações na expressão de receptores neurotransmissores e canais iônicos, neurodegeneração, neurogênese, lesão axonal, plasticidade axonal e dendrítica, resposta inflamatória, danos da barreira hematoencefálica (BHE) e angiogênese (KHARATISHVILI e PITKANEN, 2010). No entanto, não surgiu nenhum consenso sobre qual das alterações observadas é causal ao desenvolvimento da epilepsia pós-traumática (PTE). Portanto, é necessária mais informação sobre os fatores genéticos e outros fatores de risco para PTE em seres humanos para o desenvolvimento de melhores modelos animais, nos quais os tratamentos candidatos podem ser testados.

1.2.2. Eletroencefalografia (EEG)

A eletroencefalografia (EEG) é um método de monitoramento eletrofisiológico usado para registrar a atividade elétrica cerebral. A EEG mede as flutuações de tensão resultante da corrente iônica dentro dos neurônios do cérebro (NIEDERMEYER; e SILVA, 2004). Dentro de contextos clínicos, a EEG refere-se à gravação da atividade elétrica espontânea do cérebro durante um período de tempo (NIEDERMEYER; e SILVA, 2004). Na maioria dos programas de diagnóstico

clínicos, normalmente focam no conteúdo espectral da EEG, isto é, no tipo de oscilações neurais (popularmente chamadas de "ondas cerebrais") que podem ser observadas em sinais de EEG (ABOU-KHALIL e MISULIS, 2005).

Os tipos de onda EEG são geralmente classificados de acordo com sua frequência, amplitude e formato, bem como o local que está sendo registrado. A classificação mais familiar usa a frequência da forma de onda EEG (por exemplo, gamma, alfa, beta, teta, delta).

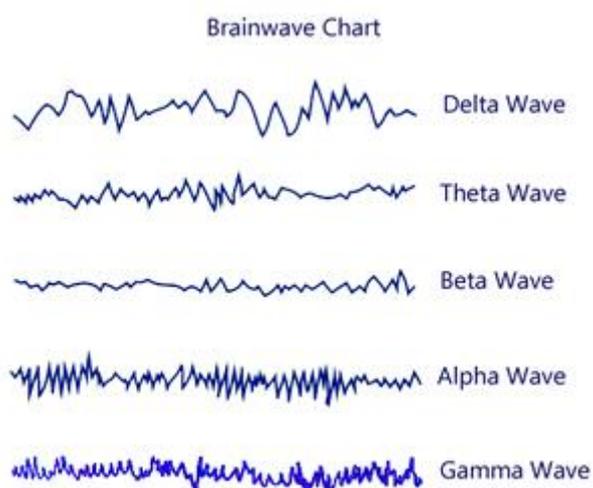


Figura 2. Tipos de ondas EEG.

A frequência (Hertz, Hz) é uma característica chave usada para definir ritmos EEG normais ou anormais. Normalmente variam entre 0,5-500 Hz. No entanto, as seguintes categorias de frequências são as mais relevantes em termos clínicos: ondas Gamma: 32 ou + oscilações por segundo, Alfa: 08 - 13 oscilações por segundo, ondas Beta: 14 - 30 oscilações por segundo, onda tetas: 04 - 07 oscilações por segundo) e ondas Delta: 0,5 - 03 oscilações por segundo (KUGLER et al., 1969).

Ondas Gamma: Aparecem durante o processamento sensorial de modalidade cruzada (percepção que combina dois sentidos diferentes, tais como audição e visão)(KISLEY e CORNWELL, 2006). Também é exibida durante a correspondência de memória de curto prazo dos objetos reconhecidos, sons ou sensações táteis.

Ondas Alfa: As ondas alfa geralmente são vistas em todas as faixas etárias, mas são mais comuns em adultos. Eles ocorrem ritmicamente em ambos os lados da cabeça, mas geralmente são ligeiramente maiores em amplitude no lado não

dominante, especialmente em indivíduos destros. A atividade alfa desaparece normalmente com atenção (por exemplo, aritmética mental, estresse, olhos em abertura). Na maioria dos casos, é considerado como uma forma de onda normal. Uma exceção anormal é alfa é o coma, mais frequentemente causada por encefalopatia hipóxico-isquêmica de processos destrutivos, por exemplo, hemorragia intracerebral. Em coma, as ondas alfa são distribuídas uniformemente, tanto anterior quanto posteriormente, em pacientes que não respondem aos estímulos.

Ondas Beta: As ondas betas são observadas em todas as faixas etárias. Elas tendem a ser pequenas em amplitude e geralmente são simétricas e mais evidentes porção anterior da cabeça. Drogas, como barbitúricos e benzodiazepinas, aumentam as ondas betas.

Ondas Teta: As ondas teta normalmente são vistas no sono em qualquer idade. Em adultos acordados, essas ondas são anormais se ocorrerem em excesso. As ondas teta e delta são conhecidas coletivamente como ondas lentas.

Ondas Delta: Estas ondas lentas têm uma frequência de 3 Hz ou menos. Eles normalmente são vistos em sono profundo em adultos, bem como em bebês e crianças. As ondas delta são anormais no adulto acordado. Muitas vezes, elas têm a maior amplitude de todas as ondas. As ondas delta podem ser focais (patologia local) ou difusas (disfunção generalizada).

A EEG é frequentemente utilizada para o diagnóstico de epilepsia, o que traz algumas anormalidades nas leituras dos exames de EEG. Gibbs, Davis e Lennox (PAZZANESE e PUPO, 1948) classificaram as anomalias gráficas do eletroencefalograma (EEG) dos epiléticos levando em conta particularmente a morfologia que apresentam. Tais anomalias, pelo seu caráter súbito, paroxístico e passageiro, são chamadas de disritmias. Três tipos distintos de disritmias são descritos: pequeno mal, grande mal e psicomotor.

A disritmia tipo pequeno mal (P. M.) é a mais característica, apresentando-se como uma sucessão alternada de ondas lentas e rápidas, sobrevindas abruptamente num surto de curta duração (1 a 5 segundos), que termina, na maioria das vezes, de modo súbito. É este um complexo bem definido em eletroencefalografia, o complexo “Spikes and wave” ou espícula onda (PAZZANESE e PUPO, 1948).

A disritmia do tipo grande mal (G. M.) se caracteriza pelo aparecimento de ondas rápidas com amplitudes crescentes. Contrariamente à do pequeno mal, ela é muitíssimo rara fora da crise convulsiva clínica. Seu aparecimento no traçado se identifica por descargas de ondas rápidas (frequências de 15 a 40c/s.) e de elevado potencial (75 a 300 microvolts); quando sobrevêm durante as crises, seu aparecimento já pode ser previsto horas ou mesmo dias antes, pela presença de numerosas ondas rápidas no EEG; no período do ataque se apresenta como uma sucessão de ondas muito rápidas que persistem durante todo ele (tanto na fase tônica como na fase clônica), dando lugar gradualmente a ondas lentas no fim da fase clônica, para, por fim, remanescerem somente as ondas lentas — ondas com duração de 1 a 3 segundos — na fase estuporosa pós-crise (PAZZANESE e PUPO, 1948).

A disritmia do tipo psicomotor (Psm.) se evidencia por descargas de ondas de 4 c/s. em média, com topo achatado ou serrilhado (indicando a superposição de um ritmo rápido — 14 c/s. em média — sobre o ritmo lento de base), sucedendo-se ou não a ondas de 6 c/s. ou a espículas sucessivas, positivas em relação ao eletrodo indiferente (terra) (PAZZANESE e PUPO, 1948).

1.2.3. Modelos experimentais de epilepsias e convulsões

Os modelos experimentais em animais para convulsões e epilepsia têm desempenhado um papel fundamental no avanço da compreensão dos mecanismos básicos subjacentes de ictogênese e epileptogênese. Dessa forma, esses estudos têm sido fundamentais para a descoberta e desenvolvimento pré-clínico de novas drogas antiepilépticas (LOSCHER, 2011). Os vários modelos animais podem ser atribuídos a diferentes categorias, por exemplo, modelos com crises espontâneas induzidas por alterações genéticas ou modelos com crises espontâneas induzidas química ou eletricamente; modelos com crises únicas e modelos com crises focais e/ou modelos de convulsões generalizadas (LOSCHER et al., 1999; LOSCHER e SCHMIDT, 2011).

Dentre os modelos de convulsão generalizada, destaca-se o modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ), também conhecido como pentetrazol

e metrazol. Este estimulante do SNC é amplamente usado experimentalmente para estudar crises convulsivas generalizadas tônico-clônicas, crises de ausência e para identificar fármacos que possam alterar a susceptibilidade a convulsões (SCHMIDT e LEPIK, 1988; LOSCHER et al., 1999; WHITE et al., 2008). Além disso, o PTZ é uma droga ansiogênica que pode exercer efeitos positivos sobre a cognição (JUNG e DOUSSARD-LEFAUCHEUX, 2002; RUEDA, FLOREZ e MARTINEZ-CUE, 2008).

O mecanismo de ação do PTZ é por antagonizar os receptores GABAA que, por inibir as correntes de cloreto associadas a este mesmo canal, potencializa a neurotransmissão excitatória e desencadeia as convulsões (RAMANJANEYULU e TICKU, 1984; KUPFERBERG, 2001).

O PTZ pode ser administrado através de infusão por via intravenosa (i.v), via intraperitoneal (i.p) ou subcutânea (s.c), em doses convulsivantes ou subconvulsivantes, podendo ser avaliado a latência para a primeira convulsão mioclônica, latência para a primeira convulsão generalizada tônico-clônica e a duração das convulsões (ZIENOWICZ et al., 2005; YILMAZ et al., 2007; REHNI, SINGH e KUMAR, 2008).

Existem evidências para a participação das EROs na fisiopatologia das epilepsias, entretanto determinar o seu papel é difícil, uma vez que, o estresse oxidativo pode ser causa ou consequência das crises epiléticas (WALDBAUM e PATEL, 2010). Entretanto, alguns autores descreveram que a produção de Espécies Reativas a Oxigênio (EROs) é uma consequência de crises epiléticas agudas, como as induzidas por PTZ (BASHKATOVA et al., 2000; MURASHIMA, YOSHII e SUZUKI, 2000). Contudo, as crises epiléticas também podem ser iniciadas por paradigmas que aumentem a produção de EROs, como acidente vascular encefálico, exposição a oxigênio hiperbárico e breves períodos de isquemia- reperfusão (JENSEN et al., 1992; ELAYAN et al., 2000; VELIOGLU et al., 2001).

1.3 TCE e Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é caracterizado por uma oxidação de biomoléculas que pode levar a perda de suas funções biológicas (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004) e

ocorre quando a produção de radicais livres ou EROs estão aumentados em relação às defesas antioxidantes presentes no organismo. Os radicais livres são átomos ou moléculas que ao se formarem possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL, 1989), enquanto que as EROs e espécies reativas ao nitrogênio (ERNs) são compostos igualmente reativos porém não possuem o desemparelhamento nos elétrons (DROGE, 2002). Mesmo não estando os elétrons desemparelhados, as EROs e ERNs são altamente reativas e buscam estabilidade durante sua breve existência, reagindo com outras moléculas causando danos a membranas celulares, proteínas e DNA (HALLIWELL, 2012). A produção de radicais livres e EROs fazem parte do metabolismo normal do cérebro, pois em condições normais, esses radicais livres e EROs são mantidos sob controle por mecanismos de defesa celular.

A fosforilação oxidativa é a principal formadora de EROs, onde o primeiro radical livre a ser formado é o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), principalmente no complexo I (NADH Desidrogenase) e no complexo III (ubiquinona citocromo c oxidase) da cadeia respiratória, onde a coenzima mononucleotídeo de Flavina (FNM) e o ubiquinol reduzem o oxigênio univalentemente formando o radical livre (NAVARRO e BOVERIS, 2007). A partir do $O_2^{\cdot-}$ podem ser formadas EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e outros radicais livres, como o radical hidroxil ($-OH\bullet$), que é o mais reativo. Além disso, o H_2O_2 formado pode reagir com metais como o cobre (Cu^+) ou ferro (Fe^{+2}) e (Fe^{+3}) na chamada reação de Fenton (LIANG, HO e PATEL, 2000), formando o $-OH\bullet$, que pode atuar como um eletrófilo ou nucleófilo, atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio ou acoplando-se em duplas ligações e anéis aromáticos (hidroxilação), inclusive em posições substituídas causando reações como desaminação e descarboxilação. O H_2O_2 pode reagir também com o próprio $O_2^{\cdot-}$ na chamada reação de Haber-Weiss, formando o $-OH\bullet$ (LIANG, HO e PATEL, 2000). O $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o ON formado pela óxido nítrico sintase e formar peroxinitrito ($ONOO^-$), uma ERN que causa dano nas membranas, proteínas e DNA celular (LAU e TYMIANSKI, 2010).

Para controlar a formação destas EROs, existe um sistema de defesa antioxidante composto por antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) e que envolvem todo um

sistema de moléculas auxiliares. Existem também os antioxidantes não-enzimáticos (vitaminas A, C, D e E e glutathiona reduzida) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995). Existem dois tipos de SOD, a SOD¹ que se localiza principalmente no citoplasma, mas também é encontrada nos peroxissomos, lisossomos e no espaço intermembrana mitocondrial e utilizam como cofatores o cobre e o zinco, e a SOD² ou SOD_{mn} que se localiza na matriz mitocondrial e utiliza manganês como cofator (CHANCE, SIES e BOVERIS, 1979). Estas duas enzimas catalisam a reação de dismutação do O₂-• formando H₂O₂. Já as enzimas catalase e a glutathiona peroxidase catalisam a reação de degradação de H₂O₂ em H₂O e O₂. A enzima GPx encontra-se em duas formas, uma que está presente na mitocôndria e no citosol e que utiliza selênio como cofator, e a outra localiza-se somente no citosol e não utiliza selênio como cofator. A GPx utiliza glutathiona reduzida (GSH) para a reação, formando glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da reação do hidroperóxido (MILLS, 1960). Para restaurar a molécula de GSH, a enzima GPx funciona acoplada a glutathiona redutase (GR), que reduz a molécula de GSSG para GSH utilizando NADPH (MAIORINO, GREGOLIN e URSINI, 1990).

Dentre os diversos danos resultantes da produção exacerbada de radicais livres destaca-se a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos como o malondialdeído (MDA), dienos conjugados e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (HOTZ, HOET e LAUWERYS, 1987). Estudos em modelos experimentais de TCE tem evidenciado um dano aos lipídeos de membrana logo após o TCE, tendo um aumento máximo em duas horas e continuando aumentado em até 48 horas após o trauma (VAGNOZZI et al., 1999).

1.4 CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), pertence ao grupo das purinas alcalóides, e é um psicoestimulante comumente consumido em todo o mundo. Esta trimetilxantina é encontrada em bebidas como café, mate, chá e refrigerantes, assim como em chocolates. Também é utilizada pela indústria farmacêutica na composição de analgésicos, estimulantes do apetite e alguns antivirais (GILBERT et al., 1976; BERNSTEIN et al., 2002).

1.4.1 Metabolismo

O metabolismo da cafeína é caracterizado por uma rápida e completa absorção gastrointestinal (WALTON, DORNE e RENWICK, 2001), sendo que após a administração oral a absorção ocorre em 45 minutos (CHVASTA e COOKE, 1971; BLANCHARD e SAWERS, 1983).

.A meia vida, tempo necessário para que sua concentração plasmática diminua pela metade, varia entre as faixas etárias, na gravidez, em combinação com alguns medicamentos e com a integridade hepática. Em adultos saudáveis a meia vida é de aproximadamente 3-4 horas, enquanto que em ratos é mais curta (cerca de uma hora). Mulheres que usam anticoncepcionais a meia vida é de 5-10 horas e naquelas em gestação de 9-11 horas. Já em recém-nascidos a meia-vida é de 30 horas. Nos indivíduos com doença hepática, a meia-vida da cafeína pode chegar até 96 horas. O metabolismo da cafeína pode ser alterado por outros compostos, por exemplo, o consumo de tabaco diminui a meia-vida da cafeína (FREDHOLM et al., 1999).

.A cafeína distribui-se nos tecidos e é encontrada em todos os fluidos corporais, incluindo o plasma, fluido cérebro-espinhal, saliva, bile, sêmen, leite materno, sangue do cordão umbilical, bem como todos os órgãos, entretanto não há o acúmulo de cafeína e/ou seus metabólitos (ARNAUD, 1976). Em ratos adultos, por exemplo, a concentração de cafeína no plasma é semelhante à encontrada no líquido cérebro-espinhal (LIU et al., 2006).

O metabolismo de primeira passagem é mínimo (YESAIR, BRANFMAN e CALLAHAN, 1984) ou inexistente em humanos (ARNAUD et al., 1983). As enzimas do citocromo P-450 são as responsáveis pelo metabolismo da cafeína no fígado, sendo degradada em dimetilxantinas, como a paraxantina, teobromina e teofilina. Cada um destes metabólitos tem suas funções no organismo, sendo excretados na urina após metabolizados. Nos humanos, a paraxantina é o metabólito predominante (72 a 80%), enquanto em roedores, apesar da paraxantina ser o metabólito plasmático predominante, os níveis de teofilina também estão elevados (YESAIR et al., 1984).

1.4.2 Mecanismo de ação da Cafeína

A cafeína em baixas concentrações (μM) pode antagonizar todos os receptores de adenosina (A1, A2A, A2B and A3), sendo que a maior parte de suas ações é mediada pela inibição dos receptores de alta afinidade A1 e A2A (FREDHOLM et al., 1999). Estes, são receptores acoplados a proteína G que afetam muitas vias de sinalização intracelular, incluindo a via do AMPc. A ativação dos receptores dos subtipos A1 e A3 leva a uma inibição da enzima adenilato ciclase através de uma proteína G inibitória, diminuindo os níveis intracelulares de AMPc. Entretanto, a ativação dos receptores A2A e A2B estimula a adenilato ciclase através de uma proteína G estimulatória aumentando os níveis intracelulares de AMPc (OLAH e STILES, 1995).

A cafeína é normalmente ingerida de uma forma crônica, sendo que seus efeitos em longo prazo podem ser diferentes dos efeitos da administração aguda, especialmente em relação à sua ação sobre os receptores de adenosina (JACOBSON et al., 1996). Isso pode se dar em função de um aumento na expressão dos receptores do tipo A1 e A2A ou por sensibilização dos receptores de adenosina (BIAGGIONI et al., 1991; JACOBSON et al., 1996).

Em altas concentrações, a cafeína pode elevar os níveis intracelulares de AMPc através da inibição da fosfodiesterase 4 (FREDHOLM et al., 1999). Em concentrações na faixa de mM a cafeína pode mobilizar cálcio dos estoques do retículo endoplasmático através dos receptores IP3 e de rianodina (FREDHOLM e HEDQVIST, 1980; FREDHOLM et al., 1999).

.A maioria dos estudos discute uma relação entre o efeito neuroprotetor da cafeína e antagonismo dos receptores A2A, que levaria a uma diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios (KALDA et al., 2006), porém um aumento na expressão dos receptores A1, cuja ativação pode significar neuroproteção ou um aumento das defesas antioxidantes, poderia ser um mecanismo alternativo (CUNHA et al., 2006).

Além disso, a cafeína pode agir via ativação da expressão gênica do fator nuclear relacionado ao eritróide-2 (Nrf2), que ocorre na mesma região promotora da Cox e é um fator de transcrição sensível ao estado redox. A estimulação da via Nrf2 resulta em aumento no mecanismo endógeno contra dano oxidativo, caracterizado

pelo aumento na expressão de GST, que suporta seu potencial neuroprotetor (CHAN et al., 2000; SCHWARZSCHILD, CHEN e ASCHERIO, 2002; ASCHERIO et al., 2004; HARVEY, SEIB e LUCKE, 2009). Além disso, Cavin e colaboradores (2008) sugerem que o café medeia a estimulação da via Nrf2 resultando em um aumento dos mecanismos de defesa endógenos, como o aumento na expressão das enzimas que regulam a síntese de GSH (CAVIN et al., 2008).

Alguns estudos também demonstraram que a cafeína e seus metabólitos apresentam efeitos antioxidantes in vitro, sendo inclusive capaz de reagir diretamente com OH (SHI, DALAL e JAIN, 1991; LEE, 2000; GOMEZ-RUIZ, LEAKE e AMES, 2007). A maioria dos estudos sobre cafeína e estresse oxidativo foram feitos in vitro, entretanto, outros estudos sugerem que a cafeína pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes in vivo (ROSSOWSKA e NAKAMOTO, 1994; MUKHOPADHYAY, MONDAL e PODDAR, 2003).

1.5 JUSTIFICATIVA:

Sabe-se que 70 – 90 % dos casos de TCE são classificados como leves, entretanto, há uma escassez de estudos relacionados a epileptogênese após um único caso de TCE leve, assim como os pacientes com início precoce de convulsões possuem maior risco do desenvolvimento de epilepsia tardia, por isso se faz necessários estudos em uma janela inicial após a lesão. Neste mesmo sentido, pouco se sabe a respeito do potencial antioxidante da cafeína, sendo esta considerada a substância psicoativa mais habitual e amplamente ingerida no mundo, o seu efeito profilático é alvo de diversos estudos, principalmente com doenças neurodegenerativas, entretanto, trabalhos com o consumo de cafeína e TCE, apresentam uma carência na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o TCE leve promove um aumento na susceptibilidade a convulsões induzidas por PTZ em uma janela de quatro dias pós-lesão, assim como verificar se o pré-tratamento sub-crônico com a cafeína poderia promover uma proteção antioxidante inicial após o TCE.

2.2 Objetivos Específicos

A. Verificar se os animais submetidos ao TCE apresentam alterações eletroencefalográficas vinte e quatro horas e quatro dias após a lesão e se o pré-tratamento crônico com cafeína possui efeito protetor.

B. Verificar se o pré-tratamento crônico com a cafeína altera os níveis de 4-HNE e de GSH/GSSG vinte e quatro horas após o TCE.

C. Verificar se o pré-tratamento crônico com a cafeína altera a atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) vinte e quatro horas após o TCE.

3. Artigo Científico

Analysis Of Mild Traumatic Brain Injury On Susceptibility Of Pentilenotetrazol And The Effect Of Pre-Treatment With Caffeine In Rats

Luís Roberto Hart da Silva	luis.rhs@gmail.com	+55 55 3220 6181	a*
Gustavo Cassol	gtcassol12@hotmail.com	+55 55 3220 6181	a
Leandro Rodrigo Ribeiro, PhD.	leandrorodrigoribeiro@yahoo.com.br	+55 55 3220 6181	a
Douglas Buchmann Godinho	douglasbuchmanngodinho@gmail.com	+55 55 3220 8978	a
Ana Flavia Furian, PhD.	anaflaviafurian@yahoo.com.br	+55 55 3220 9378	b
Mauro Schneider Oliveira, PhD.	oliveira.ms@gmail.com	+55 55 3220 9378	b
Michele Rechia Fighera, PhD.	mrfighera@yahoo.com.br	+55 55 3220 6181	a,b
Luiz Fernando Freire Royes, PhD.	nandoroyes@yahoo.com.br	+55 55 3220 6181	a,b

^a Laboratório de Bioquímica do Exercício, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brazil

Introduction

Traumatic Brain Injury (TBI) is a public health problem, one of the most frequent causes of brain injury and death in young adults, reaching around 10 million people per year worldwide and around 5.3 million people live with sequelae caused by the injury (ZITNAY, 2005; FEIGIN et al., 2013). By definition, TBI is considered to be an injury to the brain caused by external physical force, which may cause temporary or permanent behavioral or emotional disturbances (Smith e Winkler, 1994) . The trauma can be classified as mild, moderate or severe.

Among the lesions distributions, can be classified as focal or diffuse and as to their progression, it is classified according to the onset time, being divided into primary and secondary damage. The primary damage consists essentially of the immediate and irreversible mechanical damage caused at the moment of impact and includes bone fractures, axonal, meningeal, vascular and immediate cell death (SAATMAN et al., 2008), giving rise to the secondary damage, including all metabolic, cellular and molecular events, extending from

initial minutes to years after TBI. Secondary damage is developed through a serie of pathophysiological processes such as: edema, hydroelectrolytic imbalance, excitotoxicity, hypoxia-ischemia, oxidative and nitrosative stress, inflammation, apoptosis and cell necrosis (WERNER e ENGELHARD, 2007; AARABI e SIMARD, 2009) (GRAHAM et al., 2000).

It has been shown that these abnormalities after TBI promote an increase in neuronal excitability, as well as spontaneous seizures and epilepsy (MCKINNEY et al., 1997; PITKANEN e LUKASIUK, 2009). Clinically, posttraumatic epilepsy (PTE) refers to the condition in which recurrent spontaneous seizures occur more than a week after TBI (FREY, 2003; PITKANEN e MCINTOSH, 2006). Considering that patients with the early onset of seizures may be at increased risk of late epilepsy (KHARATISHVILI e PITKANEN, 2010), our group has already demonstrated in animal models the susceptibility to seizures 4 days after severe TBI (SARAIVA et al., 2012), however, there is still a lack of data regarding susceptibility after mild brain injury, and this type of TBI occurs in 70-90% of cases (JAGER et al., 2000; MINEN et al., 2016).

Moreover, it is known that there is a direct relationship between the levels of oxidative stress and the pathogens resulting from TBI, which is characterized by an oxidation of biomolecules that may lead to the loss of their biological functions (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004) and occurs when the production of free radicals or ROS are increased in relation to the antioxidant defenses present in the body. In this imbalance between free radical levels and antioxidant defenses, the use of some compound with antioxidant properties would help restore a state of equilibrium.

This way, caffeine, a methylxanthine, is taken daily by about 70% of the world population at a dose of approximately 200/250mg / kg / day (LI et al., 2008). Structurally, caffeine is similar to adenosine, an endogenous neuromodulator and binds to adenosine receptors to act as a non-selective antagonist (FREDHOLM e LINDSTROM, 1999). Experimental and clinical studies have indicated that chronic caffeine supplementation provides neuroprotective effects against various neurological disorders (KALDA et al., 2006; XU et al., 2006), Including demonstrating an antioxidant potential (VARMA, KOVTUN e HEGDE, 2010; AOYAMA et al., 2011). In our group, it has been demonstrated the antioxidant effect of caffeine in relation to the susceptibility to convulsions induced by pentylenetetrazole (PTZ) (SOUZA et al., 2013), however, there are few studies with chronic caffeine consumption along with TBI. Therefore, the objective of the study is to assess

whether mild TBI would lead to an increase in seizure susceptibility in a four-day post-injury window, as well as whether chronic treatment with caffeine could promote early protection after TBI.

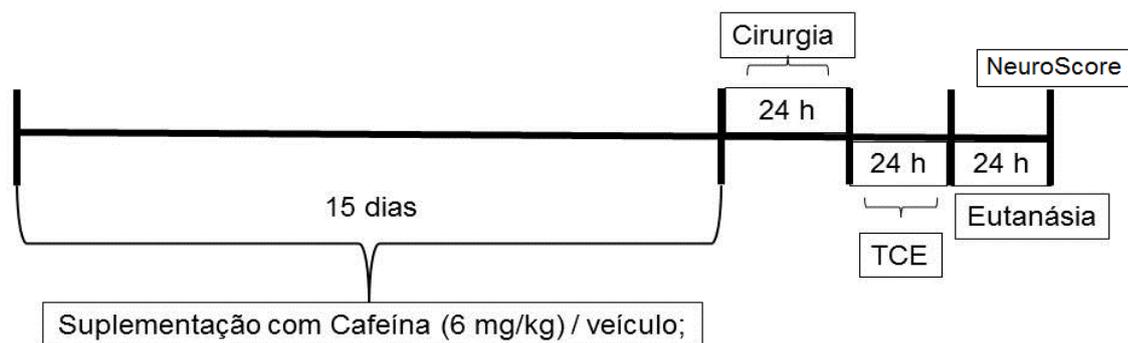
Materials and Methods

Animals and Reagents

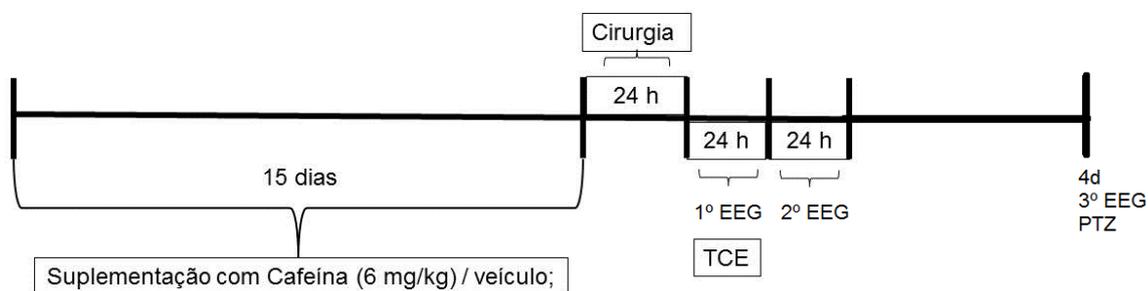
This study used adult male Wistar rats (250-350 g) that were maintained in a controlled lighting environment (12:12 h light-dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. All experimental protocols were planned to reduce the suffering and number of animals. All experiments were conducted in accordance with national and international legislation (the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the U.S. Public Health Service (PHS) Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animal guidelines) and were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Santa Maria CEUA: 1814020315. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Behavioral tests were conducted during the clear phase of the cycle. The anhydrous caffeine was dissolved in water and the PTZ was dissolved in 0.9% physiological saline.

Experimental design

Protocol 1: Animals were first divided into four groups: sham saline, sham caffeine, TBI saline, TBI caffeine, animals belonging to caffeine groups received caffeine pre-treatment (6 mg / kg) via intragastric gavage for 15 days (SOUZA et al., 2013), the control group will only receive the vehicle (water). Twenty-four hours after the last gavage, surgery was performed for the cannula implantation for the TBI and a twenty-four hour interval prior traumatism induction by fluid percussion. Twenty-four hours after TBI, the animals passed the neuroscore test and were subsequently euthanized, removing the ipsilateral cortex (hemisphere of the lesion) for biochemical analysis.



Protocol 2: Grouping and pre-treatment of caffeine was similar to Protocol 1. Twenty-four hours after the last gavage, surgery was performed to implant the cannula for the TCE together with the electroencephalograph electrode (EEG). The first EEG recording was performed after twenty-four hours after the animals were induced to the trauma by fluid percussion, twenty-four hours after the TBI, the second EEG record was recorded. Four days after TBI, the last EEG recording was performed, as well as the PTZ test (35 mg / kg), which was also recorded, after the animals were euthanized.



Surgical procedures

The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of Equithesin and placed in a rodent stereotaxic apparatus. The coordinates previously described by D'Ambrosio *et al.* (D'AMBROSIO *et al.*, 2004). A 3 mm diameter bore was made in the right convexity of the skull, 2 mm posteriorly to the bregma and 3 mm laterally to the midline, taking care to keep the dura mater intact. A plastic cannula was placed on the craniectomy and fixed with dental cement. During the surgery for implantation of the cannula, electrodes for EEG recording were implanted in all animals of Protocol 2. Two screws were placed over the parietal cortex, one rostral to the craniectomy and the other contralateral to the craniectomy, along with a ground connection positioned over the nasal sinus. All electrodes were connected

to a multipolar socket fixed to the skull with dental cement. After hardening of the dental cement, the cannula was filled with 0.9% saline and closed with a suitable plastic cap and the animal was removed from the stereotactic device, returning to its carton with appropriate postoperative care.

Traumatic brain injury

The FPI was conducted as previously described (MCINTOSH et al., 1989). After twenty-four hours, the animals were anesthetized with isoflurane, the injury cannula was attached to the fluid percussion device (Amscien Instrument, model FP302, Richmond, VA, USA). TBI was induced by transient fluid pressure (1.1 ± 0.09 atm) applied against the exposed dura, from the parameters collected, we concluded that mild TBI was induced (KABADI et al., 2010; GERBATIN et al., 2016). The sham-operated animals underwent identical procedures with the exception of the FPI. Immediately after these procedures, the cannula was closed and covered with dental cement. During the surgery and subsequent recovery, the body temperature was maintained with a circulating water heating pad.

Motor Function Assessment

The neuroscore (NS) test was employed to assess motor function at 24 h post-TBI-injury or sham-injury. The NS test was performed based on Bederson, 1986 (BEDERSON et al., 1986) in order to verify the seriousness of the TBI. The rats were kept gently by the tail, suspended one meter above the ground, and observed for flexion of the leg. Normal rats extend both legs to the floor. Rats that extended both anterior limbs to the floor and had no other neurological deficit were assigned grade 0. Rats with lesions consistently flexed the contralateral limb contralateral to the injured hemisphere; The posture ranged from slight flexion of the wrist and shoulder adduction with extension at the elbow for severe posture with full flexion of the wrist, elbow and adduction with internal rotation of the shoulder. Mice with any amount of flexing of the front paws with no other abnormalities were scored 1. The rats were then placed on a sheet of soft paper coated with plastic that could be gripped tightly by their claws. With the tail held by hand, gentle lateral pressure was applied behind the mouse's shoulder until the forelegs slid several inches. The maneuver was repeated several times in each direction. Normal or slightly dysfunctional rats resisted sliding equally in both directions. Severely dysfunctional rats had consistently reduced lateral thrust resistance toward the paretic side and were graded 2. The rats were then allowed to move freely and were observed for the surrounding behavior. The rats that circulated towards the paretic side

were consistently classified 3. Frontfoot flexion was always observed in rats with decreased resistance to lateral thrust; Both forearm flexion and decreased lateral thrust resistance were always observed in rats exhibiting surrounding behavior. Neurological examination was performed in 3 to 5 min.

PTZ test, Behavioral Evaluation and EEG Recordings

To determine whether the seizure threshold was reduced after TBI and to detect any increase in susceptibility to seizures after TBI, we used a single subvulsive dose of 35 mg / kg (i.p.) of PTZ body weight, appropriate and tested for Wistar rats (MACIEJAK et al., 2010). On record days, each animal was transferred to an acrylic glass box (25 cm × 25 cm × 40 cm) and set for 20 minutes prior to EEG recording. The connector was then attached to a Faraday cage, and the EEG was recorded using a digital encephalograph (LabChart). The EEG signals were amplified, filtered (0.1-80.0 Hz, bandpass), scanned (256 Hz sampling rate) and stored on a PC for offline analysis. In all the records, a baseline recording of 10 min was obtained to establish an adequate period of control. On the fourth day after TBI, after baseline, PTZ (35 mg / kg, i.p.) was administered. The animals were observed for the onset onset of clonic and generalized tonic-clonic seizure for 20 minutes according to Ferraro et al. (FERRARO et al., 1999), which describes clonic seizures as episodes characterized by a typical partial clonic activity that affects face, head, vibrissa and forearm. Such clonal events usually last 1-2s and may occur individually or in multiple discrete episodes prior to generalization. Generalized convulsive episodes were considered as full-body clonus, involving all four limbs and tail, rearing, wild-running and jumping, followed by sudden loss of vertical posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation, respectively. During the 20-minute observation period, the latencies for the first clonic and tonic-clonic generalized seizures were measured. EEG recordings were analyzed offline using LabChart 7.2 software (AD Instruments). As previously described (FUNCK et al., 2015). Briefly, all records were normalized (no noise). The periods of baseline and post-PTZ injection were divided into periods of 10 s. The average of the cyclic height (amplitude), the mean frequency and the percentage of band types, assigned by the delta (δ , 0.5-3 Hz), theta (θ , 4-12 Hz), beta (β , 13-30 Hz) and gamma (γ , 31-80 Hz) were calculated automatically for each time using the LabChart program's toolboxes. The minutes were calculated on average.

Western blot analyses

Western blotting was performed according to Holly *et al.* 2012 (HOLLY *et al.*, 2012). Twenty-five micrograms of protein from each sample were used for Western blot analysis. Membranes were incubated overnight with the following primary antibodies: anti-4-HNE (1: 1000) and anti-actin (1: 2000) used as an internal standard. Secondary antibodies were "anti-goat" or "anti-rabbit" (Santa Cruz Biotechnology). After washing with buffer (0.1% Tween-20 in TBS), the immunocomplexes were visualized by chemiluminescence using the Amersham ECL Plus Western blotting detection kit (GE Healthcare Life Sciences) according to the manufacturer's instructions. Film signals were digitally scanned using a Hewlett-Packard scanner (HP Scanjet 3970) and quantified with NIH Image software, standardized for actin levels.

GSH/ GSSG assessment

GSH levels were determined fluorometrically as described by Hissin and Hilf, 1976 (HISSIN e HILF, 1976), using 0-phthalaldehyde (OPA) as the fluorophore. Briefly, the cortex was homogenized in 0.1 M HClO₄. The homogenates were centrifuged at 2500 g for 10 min and the supernatants from the low speed centrifugation were separated for GSH measurement. The supernatant (100 µl) was incubated with 100 µl of OPA (0.1% in methanol) and 1.8 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in the dark. Fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at the excitation wavelength of 350 nm and at the emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol GSH / g tissue. GSSG levels were measured according to Adams, 1983 (ADAMS, LAUTERBURG e MITCHELL, 1983), being expressed as nmol GSSG / g tissue.

Superoxide Dismutase and Catalase Activity

The activity of the SOD enzyme was determined according to the method proposed by Misra and Fridovich (1972) (MISRA e FRIDOVICH, 1972). This method is based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of adrenaline into adrenocortical. Briefly, the supernatant fraction (100 µl) was added to a medium containing sodium bicarbonate-carbonate buffer (50 mM, pH 10.2) and adrenaline (0.4 mM). Kinetic analysis of SOD was initiated after addition of adrenaline and the color reaction was measured at 480 nm. The activity of the CAT enzyme was determined according to the method proposed by Aebi (1984) (AEBI, 1984), being expressed per unit (1 U decomposed 1 µmol of H₂O₂ per minute in pH 7.0 at 25°C).

Protein determination

The protein content was colorimetrically measured using a method that utilizes bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard (BRADFORD, 1976).

Statistical analyses

The data were analyzed in the program GraphPad Prisma 6, using analysis of variance ANOVA two-way and expressed as mean \pm S.E.M.. Using the post-hoc of Tukey. Data were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Firstly, the Neuroscore test was performed twenty-four hours after the TBI (Table 1). No significant neurological differences were observed between the control groups and the animals that suffered the TBI.

First, the electroencephalographic recordings performed 24h and 4 days after the injury were compared with the baseline registry, done before the TBI. In both groups, no changes were found in the amplitude and average frequency, 24 h after TBI (Fig. 1A-B) and at four days after TBI (Fig. 1 C-D).

On the fourth day after TBI, the PTZ behavioral test was performed (Fig. 2), where no significant differences were found between the animals that suffered the injury, and no changes were observed in the animals that received caffeine pretreatment.

After PTZ injection, there was no change in the amplitude of the recording in both groups (Fig. 3A), however, there were significant changes in relation to the mean of the recording frequency [F (1, 36)= 33,94] (Fig. 3B). Sham control groups, TBI control and TBI caffeine compared to their respective pre-PTZ records, however, the caffeine sham group maintained its frequency at the same level prior to insult with PTZ.

After checking for frequency changes, we sought to investigate the percentage of the types of bands that were occurring. It was first verified if the record of the fourth day after the TBI already presented some alteration in relation to the control registry before the injury (Fig. 4). No alterations were found either in delta bands (Fig. 4A), theta (Fig.4B), beta (Fig. 4C). However, the control animals that received caffeine already had an increase in gamma bands [F (3, 36) = 4,230] (Fig. 4D), in relation to their sham control group, both in the control registry pre-TBI, and in four days.

Finally, we quantified the % of the bands after the PTZ insult (Fig. 5), where changes were found in the delta band [F (3, 36) = 5,033] (Fig. 5A), showing that the sham caffeine animals had a decrease in relation to their control after the PTZ injection. The changes seen in the % of theta bands [F (1, 36) = 40,11] (Fig. 5B) were in relation to the basal recording of the

fourth day, where the only group that did not present changes was the saline control group. In relation to the beta bands (Fig. 5C), the sham saline, TBI saline and TBI caffeine groups showed a decrease compared to the basal records of the fourth day [$F(1, 36) = 29,67$], however, the control animals that received caffeine maintained the same percentage. Finally, the changes in the gamma bands [$F(1, 36) = 51,98$] (Fig. 5D) were also in relation to the basal recording of the fourth day after the injury, showing a decrease in this wave percentage.

The biochemical results obtained twenty-four hours after the injury demonstrated that TBI promoted an increase in a 4-HNE cell damage marker [$F(1, 18) = 59,48$] (Fig. 6), on the other hand, previous caffeine consumption decreased this marker [$F(1, 18) = 48,01$].

The mild TBI promoted an increase in GSH levels twenty-four hours after the injury [$F(1, 24) = 9,872$] (Fig. 7A), however, there was no difference in the levels of oxidized glutathione (GSSG) (Fig. 7B). By default, a balance of this system is done through the GSH ratio by GSSG, however, there were no differences between the groups (Fig. 7C).

The enzymatic results of Superoxide Dismutase and Catalase demonstrated that in this temporal window there is no change in the activity of the SOD enzyme after the mild TBI (Fig. 8A), however, within twenty four hours after the injury an increase in activity of the enzyme Catalase in the animals that suffered trauma [$F(1, 20) = 8,293$] (Fig. 8B), however, caffeine did not change the activity.

Discussion

The first results obtained support to validate the severity of the TBI. The comparison of the electroencephalographic records made 24h and 4 days after the injury with the base record, recorded before the trauma, where no significant differences were observed. As well as the result of the neuroscore, where also no changes were seen in relation to the control groups. Previous evidence of neuroscore with severe TBI showed significant changes in the animals that suffered the injury (DA SILVA FIORIN et al., 2016).

In this study, in order to determine the presence of seizure susceptibility, we performed the PTZ test in a mild TBI model. Susceptibility to PTZ-induced seizures is a standard and widely used experimental model to clinical generalized seizure, with well-established validity (LOSCHER et al., 1991). Studies have shown that, in severe TBI, this dosage showed seizures within four days after injury (SARAIVA et al., 2012), however, our results demonstrate that after a mild injury, this PTZ dosage is not sufficient to have generalized seizures. Although some caffeine sham animals became more susceptible to seizures [L2], the data presented were not significant.

Most of the analysis in relation to the pathological EEG record occurs through the morphology of the wave types, as regards epilepsy, clinical electroencephalography has its fundamental basis in the works of F. Gibbs, H. Davis and W. Lennox (PAZZANESE e PUPO, 1948). Alterations in the records outside the seizure are more associated with what has been classified as "Little Evil Disorder", where there is an alternating succession of slow and fast waves, this complex being defined as "waves and spikes". On the other hand, dysrhythmia of

the big type is badly characterized by fast waves (high frequency) with increasing amplitudes, when they occur during the attacks, their appearance can already be predicted hours or even days before, by the presence of numerous fast waves in the EEG;

Records after PTZ injection showed no differences between the groups, however, there were different responses regarding the control recording of the fourth day after the injury. Where the animals that received only caffeine showed a higher frequency in the registry in relation to the other groups, as well as a higher % in the waves of higher frequency (beta,gamma). There are few works with caffeine and brain injury, in a study where caffeine was used acutely after severe TBI, caffeine demonstrated an initial protection against the neuroscore test in the EEG registers performed 4 weeks after the injury, a single dose of caffeine after severe TBI demonstrated a decrease in the periods of epileptiform bursting (LUSARDI et al., 2012).

In another study where caffeine was administered before TBI in a sub-chronic manner, caffeine demonstrated a 50% decrease in neurological deficits 24h after TBI, as well as attenuated glutamate levels and reduced inflammatory cytokine production (LI et al., 2008). Going according to positive results found in our study, where caffeine decreased 4-HNE levels, demonstrating initial protection after TBI. However, although mild TBI influence the increase in GSH levels and Catalase activity, caffeine in this dosage, or in that time window, did not promote changes.

A probable route by which caffeine can exert its antioxidant effect is via activation of the nuclear expression of nuclear factor related to erythroid-2 (Nrf2), a redox-sensitive transcription factor. The stimulation of the Nrf2 pathway results in an increase in the endogenous mechanism against oxidative and electrophilic damage characterized by increased transcription of several genes encoding antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx (CHEN, ZHANG e CAI, 2014), however, this response after the injury occurs only 48h post TBI (MILLER et al., 2014), and the caffeine consumption protocol used in this study was not able to anticipate this protection.

Therefore, our study showed that a mild TBI does not increase susceptibility to PTZ four days after the injury, however, it promotes some changes in the frequency of recording, mainly in the wave type. And previous consumption of caffeine has shown a decrease in lipid peroxidation levels 24h after TBI, which may interfere with the activity of some important membrane enzymes, such as Na + K + -ATPase. However, more studies are needed to understand more about the mechanisms that a mild TBI might be working.

Acknowledgments

This work was supported by the FAPERGS / CNPq (grants: Pronem: 11/2082-4). L.R.H Silva, M.R. Figuera and L.F.F. Royes are recipients of CNPq fellowships. All authors confirm that there is no competing financial conflict of interest.

Legends

SCORES						
Sham Saline	0	0	0	0		
Sham Caffeine	0	0	0	0		
TBI Saline	0	0	0	0	0	0
TBI Caffeine	0	0	0	0	0	0

Table 1: Neuroscore test. No differences were found between the TBI and control groups.

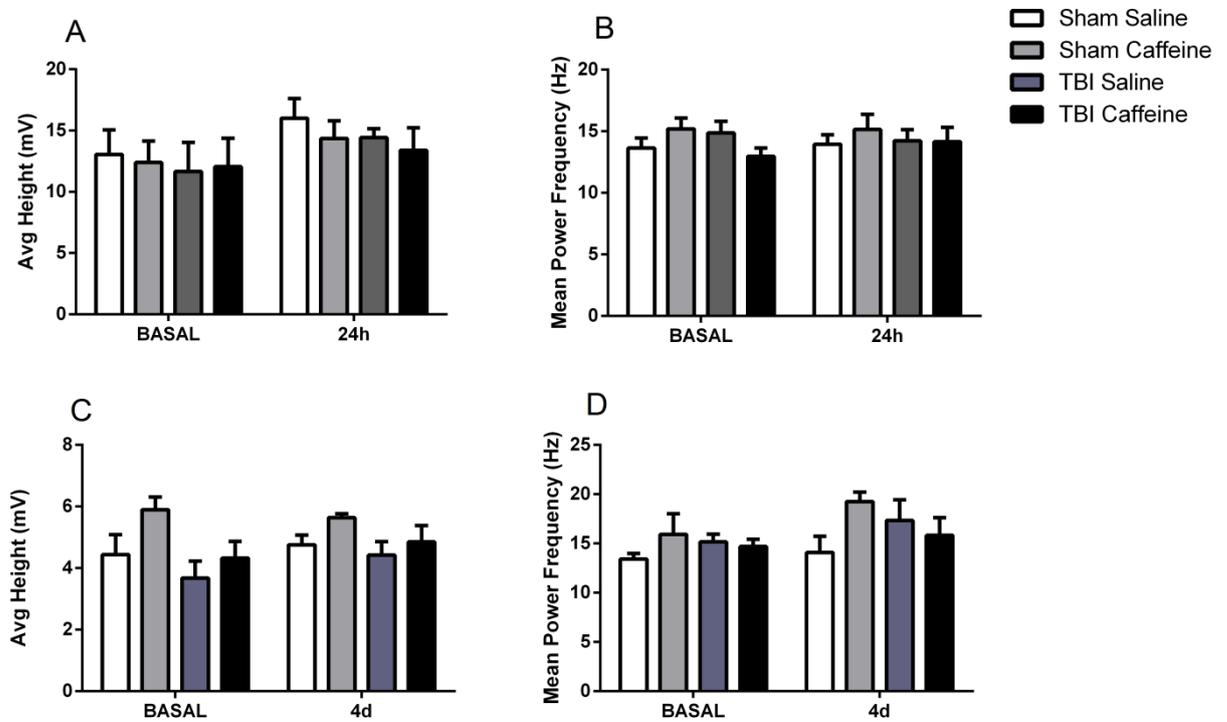


Figure 1. Electroencephalographic results of amplitude and frequency twenty four hours after TBI (A, B) and four days after injury, amplitude and frequency respectively (C, D). No differences were found between the TBI, caffeine and control groups.

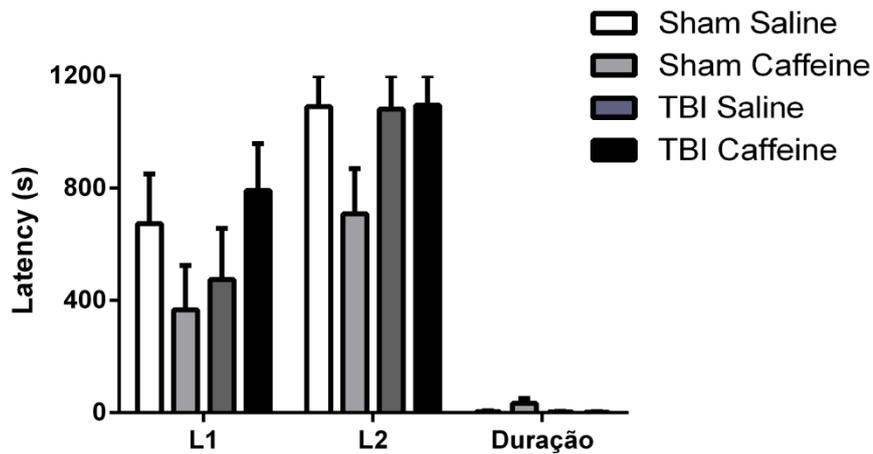


Figure 2. PTZ test results four days after TBI, latency for clonic seizures (L1), generalized tonic-clonic (L2) and its duration. No significant differences were found between the TBI, caffeine and control groups.

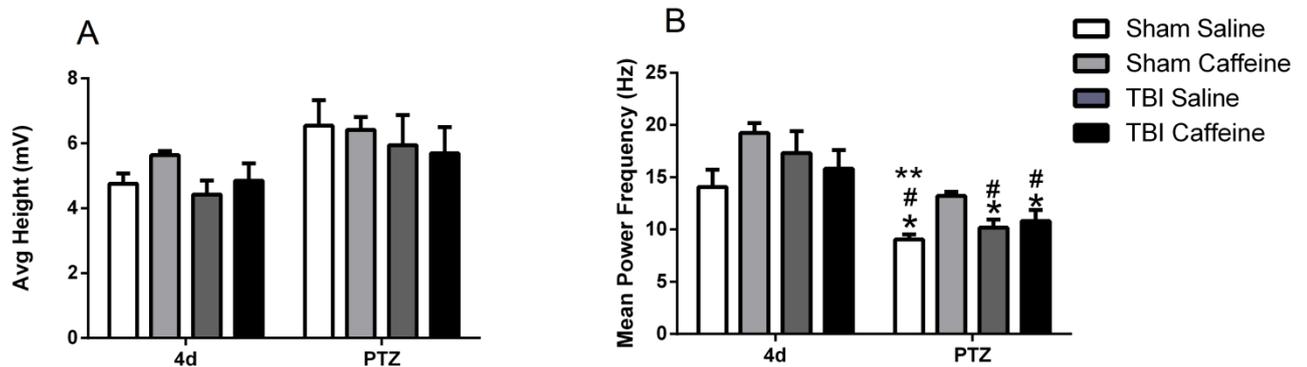


Figure 3. EEG recording four days after mild TBI, along with the PTZ test. Results of amplitude (A), and mean frequency (B) of the record. * Difference from the group: 4d sham caffeine; # Difference from the group: 4d TBI saline; ** Difference in relation to the group: 4d TBI caffeine. $P < 0.05$.

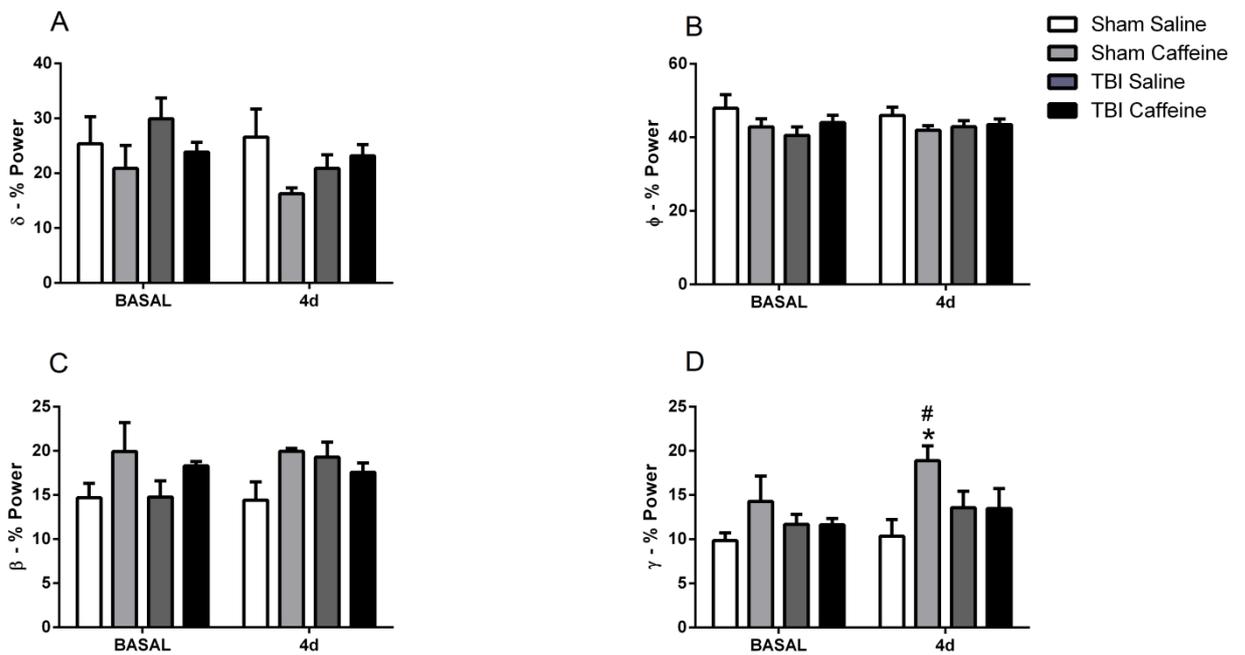


Figure 4. % bands control records and four days. % Delta band (A), theta (B), beta (C), gamma (D). * Difference from the group: Basal sham saline; # Difference from the group: 4d sham saline. $p < 0.05$.

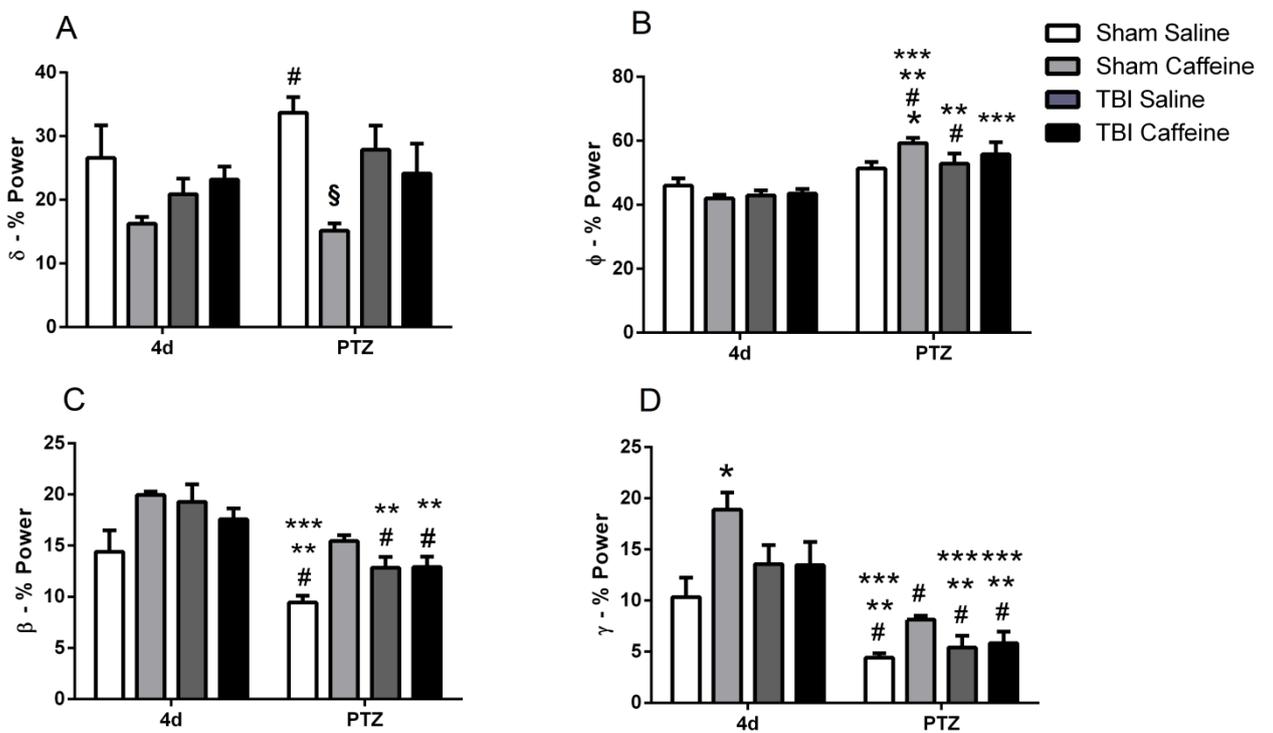


Figure 5. Quantification % bands after the PTZ test. % Delta band (A), theta (B), beta (C), gamma (D). * Difference from group 4d sham saline; # Difference from the 4d sham caffeine

group; ** difference from group 4d TBI saline; *** difference compared to group 4d TBI caffeine; § difference compared to PTZ group sham saline. $p < 0.05$.

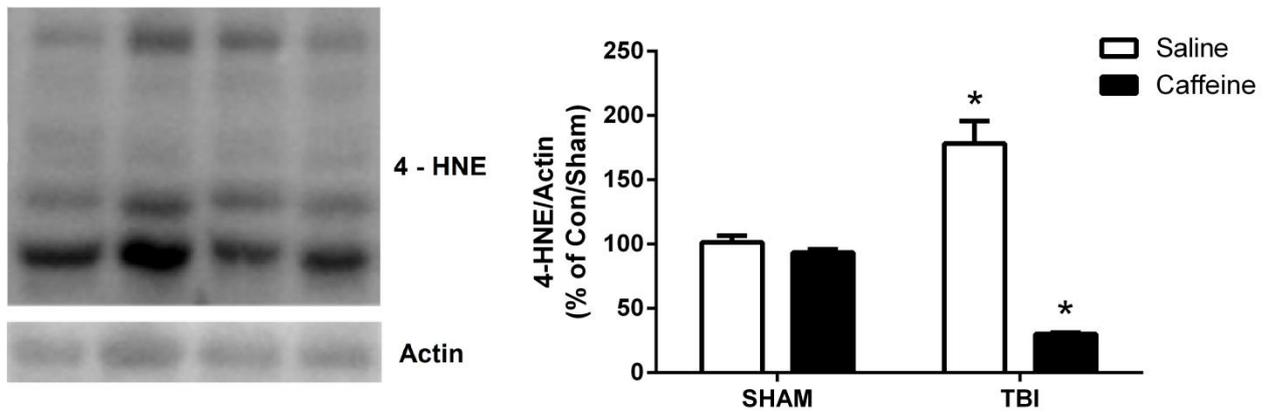


Figure 6. Western blotting 4-HNE. * Difference in relation to the other groups. $p < 0.05$.

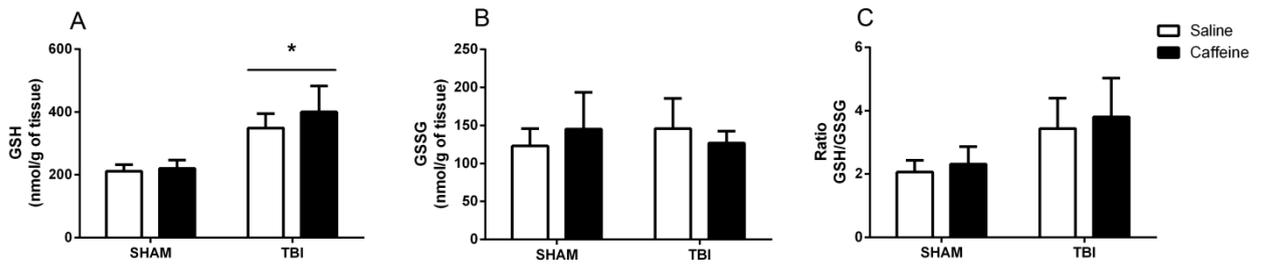


Figure 7. GSH / GSSG antioxidant system. * Significant difference in relation to the control groups. $p < 0.05$.

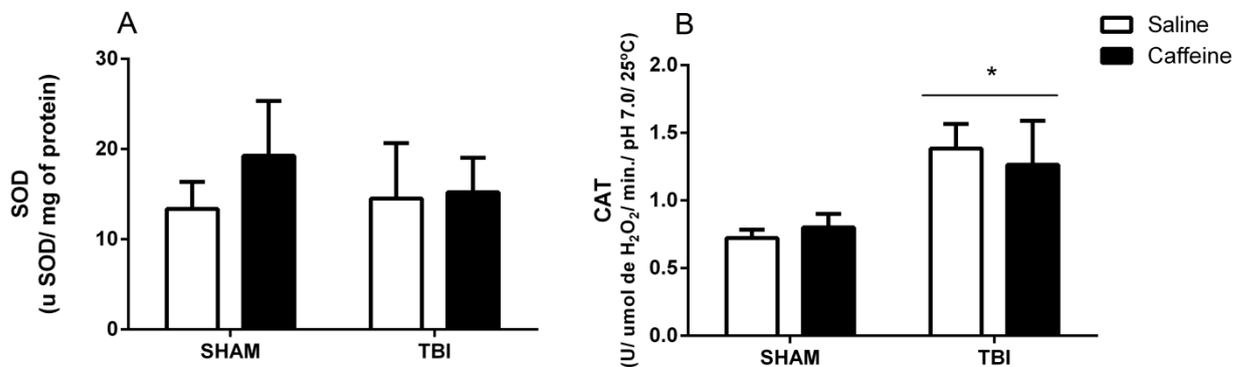


Figure 8. Enzymatic results of SOD (A) and Catalase (B) enzymes. * Significant difference in relation to the control groups. $p < 0.05$.

4. Discussão

Os primeiros resultados obtidos colaboram com a condição de um TCE considerado leve. A comparação dos registros eletroencefalográficos realizada 24h e 4 dias após a lesão com o registro base, registrado antes do trauma, onde não foram observadas diferenças significativas, mostram que em um único caso, essa lesão leve não foi capaz de promover alterações na amplitude e tão pouco na frequência média dos registros eletro encefálicos. Além dos resultados de neuroscore, onde também não foram observadas alterações em relação aos grupos de controle. Em testes anteriores de neuroscore realizados em nosso laboratório após TCE grave, foi visto alterações significativas nos animais que sofreram a lesão (DA SILVA FIORIN et al., 2016).

Neste estudo, para determinar a presença de susceptibilidade a convulsões, realizamos o teste PTZ. A susceptibilidade às convulsões induzidas por PTZ é um modelo experimental padrão e amplamente utilizado para crises clínicas generalizadas, com validade bem estabelecida (LOSCHER et al., 1991). Estudos demonstraram que, em TCE grave, esta dosagem mostrou convulsões dentro de quatro dias após a lesão (SARAIVA et al., 2012), no entanto, nossos resultados demonstram que após lesão leve, esta dosagem de PTZ não é suficiente para ter convulsões generalizadas. Embora alguns animais que consumiram cafeína se tornaram mais suscetíveis às convulsões [L2], mas os dados apresentados não foram significativos.

Procurando sintetizar de maneira mais simples o que se possa admitir por eletroencefalograma normal, diremos ser aquele que preenche as características de regularidade, constância e simetria de ritmos, dentro das faixas de frequência consideradas normais. Estas estão compreendidas na zona de frequência de 8,5 a 13 ciclos por segundo para o ritmo de repouso (alfa) e em torno de 25 ciclos por segundo para os ritmos de ação (beta). As diferenças de potencial (20 a 75 microvolts) que assinalam as ondas elétricas em uns e em outros devem também conservar os caracteres gerais de regularidade, constância e simetria (PAZZANESE e PUPO, 1948).

A maioria das análises em relação ao registro EEG patológico se dá através da morfologia dos tipos de onda, no que se refere à epilepsia, a eletrencefalografia clínica tem sua base fundamental nos trabalhos de F. Gibbs, H. Davis e W. Lennox . Alterações nos registros fora da crise convulsiva estão mais associadas ao que foi classificado como “Disritmia de Pequeno Mal”, aonde se tem uma sucessão alternada de ondas lentas e rápidas, sendo este complexo definido como “waves and spikes”. Por outro lado, a disritmia do tipo grande mal se caracteriza por ondas rápidas (frequência elevada) com amplitudes crescentes, quando sobrevêm durante as crises, seu aparecimento já pode ser previsto horas ou mesmo dias antes, pela presença de numerosas ondas rápidas no EEG (PAZZANESE e PUPO, 1948).

Em nossos estudos não foi observado a morfologia das ondas, porém quantificado de forma geral a intensidade das descargas elétricas - amplitude (mV) – e a frequência que esses sinais se repetiam (Hz). Nos registros após a injeção de PTZ não foram encontradas diferenças entre os grupos, no entanto, houve respostas diferentes ao registro de controle do quarto dia após a lesão. Onde os animais que receberam apenas cafeína apresentaram maior frequência no registro em relação aos outros grupos, bem como maior % nas ondas de maior frequência (beta, gama). Em outros estudos, a cafeína demonstrou uma proteção inicial no teste de neuroscore, assim como nos registros EEG realizados 4 semanas após a lesão, uma dose única de cafeína após TCE grave promoveu uma diminuição nos períodos de “burst epileptiforme” (LUSARDI et al., 2012).

Em outro estudo onde a cafeína foi administrada antes do TCE de forma subcrônica, a cafeína demonstrou uma diminuição de 50% nos déficits neurológicos 24 horas após o TBI, bem como níveis atenuados de glutamato e redução da produção de citocinas inflamatórias (LI et al., 2008). Indo de acordo com resultados positivos encontrados em nosso estudo, onde a cafeína diminuiu os níveis de 4-HNE, demonstrando proteção inicial após a lesão. No entanto, embora o TCE leve influencie o aumento dos níveis de GSH e da atividade da Catalase, a cafeína nessa dosagem, ou nessa janela do tempo, não promoveu mudanças.

Uma provável via pela qual a cafeína pode exercer seu efeito antioxidante é através da ativação da expressão nuclear do fator nuclear relacionado ao eritróide-2 (Nrf2), um fator de transcrição sensível ao estado redox. A estimulação da via Nrf2

resulta em um aumento no mecanismo endógeno contra dano oxidativo e eletrofílico caracterizado pelo aumento da transcrição de vários genes que codificam enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (CHEN, ZHANG e CAI, 2014), no entanto, essa resposta após a lesão ocorre apenas 48 horas após TBI (MILLER et al., 2014). Usando esse estudo como referência, o protocolo usado neste trabalho poderia exercer seu efeito protetor de duas maneiras, a primeira seria aumentando os níveis de defesas antioxidantes na mesma janela de tempo esperada (48h pós-TCE). E o segundo modo seria uma antecipação dessa resposta, mostrando um efeito protetor em 24h após a lesão, entretanto, o consumo de cafeína utilizado neste estudo não conseguiu antecipar essa proteção.

Embora os estudos epidemiológicos tenham indicado que o consumo de cafeína está negativamente correlacionado com a incidência de algumas doenças neurológicas (ASCHERIO, MUNGER e SIMON, 2010), seus efeitos na epilepsia ainda permanecem controversos. Enquanto alguns estudos evidenciam que a administração de altas doses de cafeína diminui o limiar para as convulsões induzidas por PTZ (CZUCZWAR et al., 1987; CUTRUFO et al., 1992) e anula o efeito protetor de algumas DAE (CHROSCINSKA-KRAWCZYK et al., 2011), outros estudos sugerem um efeito neuroprotetor para a cafeína em modelos de epilepsia (SHEN, LI e BOISON; EL YACOUBI et al., 2008).

5. Conclusão

Com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que um único caso de TCE leve não promove um aumento a suscetibilidade à PTZ quatro dias após a lesão, no entanto, promove algumas alterações eletroencefalográficas, como a frequência média dos registros após a administração de PTZ (35 mg/kg), além de alterações nos tipos de onda.

Além disso, o consumo prévio de cafeína mostrou diminuir nos níveis de peroxidação lipídica 24h após o TCE, não se descartando que a ação protetora da cafeína neste estudo seja por atuar como antagonista dos receptores de adenosina, sugere-se que seu efeito neuroprotetor se dá por atenuar o dano oxidativo e prevenir a inibição de algumas enzimas importantes.

No entanto, como o modelo de TCE leve não promoveu alterações neurológicas significativas, é difícil concluir os efeitos protetores de um composto antioxidante nesse protocolo experimental. Porém, este trabalho ajudou a esclarecer um pouco mais sobre as respostas após um único caso de TCE leve, auxiliando na busca de novas estratégias terapêuticas, e nesse contexto, mais estudos são necessários afim de se buscar compreender cada vez mais os mecanismos que o TCE pode estar atuando.

6. Referências Bibliográficas

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

ABOU-KHALIL, B.; MISULIS, K. E. Atlas of EEG & Seizure Semiology. 2005.

ADAMS, J. D., JR.; LAUTERBURG, B. H.; MITCHELL, J. R. Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 227, n. 3, p. 749-754, Dec 1983.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ANDRIESSEN, T. M.; JACOBS, B.; VOS, P. E. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 10, p. 2381-2392, Oct 2010.

AOYAMA, K. et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. **Neuroscience**, v. 181, p. 206-215, May 05 2011.

ARNAUD, M. J. Metabolism of 1,3,7-trimethyldihydrouric acid in the rat: new metabolic pathway of caffeine. **Experientia**, v. 32, n. 10, p. 1238-1240, Oct 15 1976.

ARNAUD, M. J. et al. Placental transfer of the major caffeine metabolite in the rat using 6-amino-5[N-formylmethylamino]1,3[Me-14C]-dimethyluracil administered orally or intravenously to the pregnant rat. **Toxicol Lett**, v. 16, n. 3-4, p. 271-279, May 1983.

ARREOLA-RISA, C. et al. Trauma care systems in urban Latin America: the priorities should be prehospital and emergency room management. **J Trauma**, v. 39, n. 3, p. 457-462, Sep 1995.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; SIMON, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 6, p. 599-612, Jun 2010.

ASCHERIO, A. et al. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. **Am J Epidemiol**, v. 160, n. 10, p. 977-984, Nov 15 2004.

ATKINS, C. M. et al. Deficits in ERK and CREB activation in the hippocampus after traumatic brain injury. **Neurosci Lett**, v. 459, n. 2, p. 52-56, Aug 07 2009.

BARKER-COLLO, S. L.; FEIGIN, V. L. Capturing the spectrum: suggested standards for conducting population-based traumatic brain injury incidence studies. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 1, p. 1-3, 2009.

BASHKATOVA, V. et al. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole-induced seizures. **J Mol Neurosci**, v. 14, n. 3, p. 183-190, Jun 2000.

BEDERSON, J. B. et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472-476, May-Jun 1986.

BERNSTEIN, G. A. et al. Caffeine dependence in teenagers. **Drug Alcohol Depend**, v. 66, n. 1, p. 1-6, Mar 1 2002.

BIAGGIONI, I. et al. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 258, n. 2, p. 588-593, Aug 1991.

BLANCHARD, J.; SAWERS, S. J. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. **J Pharmacokinet Biopharm**, v. 11, n. 2, p. 109-126, Apr 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976.

CAVIN, C. et al. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 4, p. 1239-1248, Apr 2008.

CHAN, S. L. et al. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. **J Biol Chem**, v. 275, n. 24, p. 18195-18200, Jun 16 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CHEN, J.; ZHANG, Z.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 5, p. 337-345, Oct 2014.

CHROSCINSKA-KRAWCZYK, M. et al. Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: experimental and clinical data. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 1, p. 12-18, 2011.

CHVASTA, T. E.; COOKE, A. R. Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. **Gastroenterology**, v. 61, n. 6, p. 838-843, Dec 1971.

CUNHA, G. M. et al. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 1775-1781, Sep 15 2006.

CUTRUFO, C. et al. Differential effects of various xanthines on pentylentetrazole-induced seizures in rats: an EEG and behavioural study. **Eur J Pharmacol**, v. 222, n. 1, p. 1-6, Nov 03 1992.

CZUCZWAR, S. J. et al. Effect of aminophylline and enprofylline on the protective efficacy of common antiepileptic drugs against electroconvulsions in mice. **Epilepsia**, v. 28, n. 4, p. 383-386, Jul-Aug 1987.

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.

DA SILVA FIORIN, F. et al. The Impact of Previous Physical Training on Redox Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats: A Behavioral and Neurochemical Approach. **J Neurotrauma**, v. 33, n. 14, p. 1317-1330, Jul 15 2016.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

EL YACOUBI, M. et al. Evidence for the involvement of the adenosine A(2A) receptor in the lowered susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures produced in mice by long-term treatment with caffeine. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 1, p. 35-40, Jul 2008.

ELAYAN, I. M. et al. Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain. **J Neurophysiol**, v. 83, n. 4, p. 2022-2029, Apr 2000.

FAUL, M., ET AL. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002 - 2006. **SERVICES, U.S.D.O.H.A.H. Centers for Disease Control and Preventio.**, 2010.

FEIGIN, V. L. et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 1, p. 53-64, Jan 2013.

FERNANDES, R. N. R. Análise Epidemiológica das hospitalizações no Sistema Único de Saúde, por traumatismo crânio encefálico. Brasil: 2001 - 2007. **Instituto de Saúde Coletiva, UFB**, 2010.

FERRARO, T. N. et al. Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. **J Neurosci**, v. 19, n. 16, p. 6733-6739, Aug 15 1999.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 130-135, Apr 2015.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 83-133, Mar 1999.

FREDHOLM, B. B.; HEDQVIST, P. Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. **Biochem Pharmacol**, v. 29, n. 12, p. 1635-1643, Jun 15 1980.

FREDHOLM, B. B.; LINDSTROM, K. Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A(2A) receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 380, n. 2-3, p. 197-202, Sep 10 1999.

FREY, L. C. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 10, p. 11-17, 2003.

FUNCK, V. R. et al. Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. **Neuroscience**, v. 298, p. 171-179, Jul 09 2015.

GENNARELLI, T. A. G., D. I. Neuropathology. In: SILVER, J. M. **Textbook of traumatic brain injury**, v. 1, p. p. 27-50, 2005.

GERBATIN, R. D. et al. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. **Mol Neurobiol**, Nov 09 2016.

GILBERT, R. M. et al. Caffeine content of beverages as consumed. **Can Med Assoc J**, v. 114, n. 3, p. 205-208, Feb 7 1976.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, Aug 22 2007.

GOODKIN, H. P.; KAPUR, J. Responsiveness of Status Epilepticus to Treatment with Diazepam Decreases Rapidly as Seizure Duration Increases. **Epilepsy Curr**, v. 3, n. 1, p. 11-12, Jan 2003.

GRAHAM, D. I. et al. Recent advances in neurotrauma. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 8, p. 641-651, Aug 2000.

HALLIWELL, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 126, p. 23-33, 1989.

_____. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, v. 70, n. 5, p. 257-265, May 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 1, p. 125-126, Jan 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, May 2004.

HARVEY, C.; SEIB, C.; LUCKE, J. Continuation rates and reasons for removal among Implanon users accessing two family planning clinics in Queensland, Australia. **Contraception**, v. 80, n. 6, p. 527-532, Dec 2009.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-226, Jul 1976.

HOLLY, L. T. et al. Dietary therapy to promote neuroprotection in chronic spinal cord injury. **J Neurosurg Spine**, v. 17, n. 2, p. 134-140, Aug 2012.

HOTZ, P.; HOET, P.; LAUWERYS, R. [Lipid peroxidation in human pathology: evaluation of data in literature]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 35, n. 7, p. 1067-1073, Sep 1987.

JACOBSON, K. A. et al. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. **Trends Pharmacol Sci**, v. 17, n. 3, p. 108-113, Mar 1996.

JAGER, T. E. et al. Traumatic brain injuries evaluated in U.S. emergency departments, 1992-1994. **Acad Emerg Med**, v. 7, n. 2, p. 134-140, Feb 2000.

JENSEN, F. E. et al. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. **Epilepsia**, v. 33, n. 6, p. 971-980, Nov-Dec 1992.

JUNG, P.; DOUSSARD-LEFAUCHEUX, S. [Visual field defect in a patient given sodium valporate then carbamazepine: possible effect of aminotransferase inhibition]. **Rev Neurol (Paris)**, v. 158, n. 4, p. 477-479, Apr 2002.

KABADI, S. V. et al. Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. **Nat Protoc**, v. 5, n. 9, p. 1552-1563, Sep 2010.

KALDA, A. et al. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 248, n. 1-2, p. 9-15, Oct 25 2006.

KHARATISHVILI, I.; PITKANEN, A. Posttraumatic epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 2, p. 183-188, Apr 2010.

KISLEY, M. A.; CORNWELL, Z. M. Gamma and beta neural activity evoked during a sensory gating paradigm: effects of auditory, somatosensory and cross-modal stimulation. **Clin Neurophysiol**, v. 117, n. 11, p. 2549-2563, Nov 2006.

KUGLER, J. et al. La electroencefalografía en la clínica y en la práctica. 1969.

KUPFERBERG, H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 4, p. 7-12, 2001.

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

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clin Chim Acta**, v. 295, n. 1-2, p. 141-154, May 2000.

LI, W. et al. Chronic but not acute treatment with caffeine attenuates traumatic brain injury in the mouse cortical impact model. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 1198-1207, Feb 19 2008.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 563-570, 2000.

LIU, X. et al. Evaluation of cerebrospinal fluid concentration and plasma free concentration as a surrogate measurement for brain free concentration. **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 9, p. 1443-1447, Sep 2006.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, Jun 2011.

LOSCHER, W. et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. **Epilepsy Res**, v. 8, n. 3, p. 171-189, Apr 1991.

LOSCHER, W. et al. Inhibition of monoamine oxidase type A, but not type B, is an effective means of inducing anticonvulsant activity in the kindling model of epilepsy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 3, p. 984-992, Mar 1999.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657-678, Apr 2011.

LUSARDI, T. A. et al. Caffeine prevents acute mortality after TBI in rats without increased morbidity. **Exp Neurol**, v. 234, n. 1, p. 161-168, Mar 2012.

MACIEJAK, P. et al. Time course of changes in the concentrations of amino acids in the brain structures of pentylenetetrazole-kindled rats. **Brain Res**, v. 1342, p. 150-159, Jun 25 2010.

MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 448-457, 1990.

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

MCKINNEY, R. A. et al. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. **Nat Med**, v. 3, n. 9, p. 990-996, Sep 1997.

MEINARDI, H. et al. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. **Epilepsia**, v. 42, n. 1, p. 136-149, Jan 2001.

MILLER, D. M. et al. Temporal and spatial dynamics of nrf2-antioxidant response element mediated gene targets in cortex and hippocampus after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice. **J Neurotrauma**, v. 31, n. 13, p. 1194-1201, Jul 01 2014.

MILLS, G. C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. **Arch Biochem Biophys**, v. 86, p. 1-5, Jan 1960.

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

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, May 25 1972.

MUKHOPADHYAY, S.; MONDAL, A.; PODDAR, M. K. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Indian J Exp Biol**, v. 41, n. 4, p. 283-289, Apr 2003.

MURASHIMA, Y. L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Role of nitric oxide in the epileptogenesis of EL mice. **Epilepsia**, v. 41 Suppl 6, p. S195-199, 2000.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. **Front Biosci**, v. 12, p. 1154-1163, Jan 01 2007.

NIEDERMEYER, E.; SILVA, F. L. D. Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. 2004.

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

OLAH, M. E.; STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 35, p. 581-606, 1995.

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.

PAZZANESE, O.; PUPO, P. P. A ELETRENCEFALOGRAFIA NA EPILEPSIA CONSIDERAÇÕES SOBRE 271 CASOS. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. VI, n. 2, 1948.

PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 14 Suppl 1, p. 16-25, Jan 2009.

PITKANEN, A.; MCINTOSH, T. K. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 241-261, Feb 2006.

PODELL, M. The use of diazepam per rectum at home for the acute management of cluster seizures in dogs. **J Vet Intern Med**, v. 9, n. 2, p. 68-74, Mar-Apr 1995.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, M. K. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur J Pharmacol**, v. 98, n. 3-4, p. 337-345, Mar 2 1984.

REHNI, A. K.; SINGH, I.; KUMAR, M. Tramadol-induced seizurogenic effect: a possible role of opioid-dependent gamma-aminobutyric acid inhibitory pathway. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 103, n. 3, p. 262-266, Sep 2008.

REYNOLDS, E. H. Introduction: epilepsy in the world. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 6, p. 1-3, 2002.

ROSSOWSKA, M. J.; NAKAMOTO, T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. **Experientia**, v. 50, n. 5, p. 465-468, May 15 1994.

RUEDA, N.; FLOREZ, J.; MARTINEZ-CUE, C. Chronic pentylenetetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. **Neurosci Lett**, v. 433, n. 1, p. 22-27, Mar 5 2008.

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

SANDER, J. W.; SHORVON, S. D. Epidemiology of the epilepsies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 433-443, Nov 1996.

SARAIVA, A. L. et al. Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 2-3, p. 180-186, Feb 10 2012.

SCHMIDT, D.; LEPPIK, I. E. Compliance in epilepsy: introduction. **Epilepsy Res Suppl**, v. 1, p. 3-4, 1988.

SCHWARZSCHILD, M. A.; CHEN, J. F.; ASCHERIO, A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. **Neurology**, v. 58, n. 8, p. 1154-1160, Apr 23 2002.

SHEN, H. Y.; LI, T.; BOISON, D. A novel mouse model for sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): role of impaired adenosine clearance. **Epilepsia**, v. 51, n. 3, p. 465-468, Mar

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chem Toxicol**, v. 29, n. 1, p. 1-6, Jan 1991.

SIGNORETTI, S. et al. The pathophysiology of concussion. **PM R**, v. 3, n. 10 Suppl 2, p. S359-368, Oct 2011.

SILVER, J. M. E. A. Test Book of Traumatic Brain Injury. **APPI Press**, 2005.

SMITH, S. S., WINKLER, P. A. Traumatismos cranianos. **Fisioterapia neurológica**, v. 2 Ed., 1994.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc**, v. 63, n. 4, p. 381-389, Apr 1988.

SOUZA, M. A. et al. Antioxidant activity elicited by low dose of caffeine attenuates pentylentetrazol-induced seizures and oxidative damage in rats. **Neurochem Int**, v. 62, n. 6, p. 821-830, May 2013.

STRINE, T. W. et al. Psychological distress, comorbidities, and health behaviors among U.S. adults with seizures: results from the 2002 National Health Interview Survey. **Epilepsia**, v. 46, n. 7, p. 1133-1139, Jul 2005.

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

UMPHRED, D. Traumatismos Cranianos. **São Paulo: Manole**, v. 2, 1994.

VAGNOZZI, R. et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury. **J Neurotrauma**, v. 16, n. 10, p. 903-913, Oct 1999.

VARMA, S. D.; KOVTUN, S.; HEGDE, K. Effectiveness of topical caffeine in cataract prevention: studies with galactose cataract. **Mol Vis**, v. 16, p. 2626-2633, Dec 08 2010.

VELIOGLU, S. K. et al. Status epilepticus after stroke. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1169-1172, May 2001.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 88, n. 1, p. 23-45, Jan 2010.

WALTON, K.; DORNE, J. L.; RENWICK, A. G. Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the in vivo pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates. **Food Chem Toxicol**, v. 39, n. 7, p. 667-680, Jul 2001.

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

WHITE, H. S. et al. The anticonvulsant profile of rufinamide (CGP 33101) in rodent seizure models. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1213-1220, Jul 2008.

WHO. 10 FACTS ON INJURIES AND VIOLENCE. 2009.

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

XU, K. et al. Estrogen prevents neuroprotection by caffeine in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 535-541, Jan 11 2006.

YESAIR, D. W.; BRANFMAN, A. R.; CALLAHAN, M. M. Human disposition and some biochemical aspects of methylxanthines. **Prog Clin Biol Res**, v. 158, p. 215-233, 1984.

YILMAZ, I. et al. Mirtazapine does not affect pentylentetrazole- and maximal electroconvulsive shock-induced seizures in mice. **Epilepsy Behav**, v. 11, n. 1, p. 1-5, Aug 2007.

ZIENOWICZ, M. et al. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures--behavioral and immunocytochemical study. **Neurosci Lett**, v. 373, n. 3, p. 226-231, Jan 20 2005.

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