



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS**  
**PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**EFEITO PROFILÁTICO DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE MARCADORES  
DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS APÓS TRAUMATISMO  
CRÂNIOENCEFÁLICO (TCE).**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mauro Robson Torres de Castro**

**Santa Maria- RS, Brasil**

**2015**

**EFEITO PROFILÁTICO DO TREINAMENTO AERÓBICO  
SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO  
FÍGADO DE RATOS APÓS TRAUMATISMO  
CRÂNIOENCEFALICO (TCE)**

**Mauro Robson Torres de Castro**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Área de Concentração Aspectos Biológicos e Comportamentais da educação Física e da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção o grau de **Mestre em Educação Física**.

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS**  
**PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de**  
**Mestrado**

**EFEITO PROFILÁTICO DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE**  
**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS**  
**APÓS TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFALICO (TCE)**

elaborada por

**Mauro Robson Torres de Castro**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Educação Física**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Dr Frederico Diniz Lima (UFSM)**

---

**Dr<sup>a</sup> Mauren Assis de Souza (UNIPAMPA)**

*Dedico esta dissertação à minha namorada.*

*A capacidade de se colocar no lugar do outro é uma das funções mais importantes da inteligência. Demonstra o grau de maturidade do ser humano.*

*Augusto Cury*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, fortaleza incontestável em minha vida. Um agradecimento especial a minha namorada por ter dedicado uma parte de sua vida em me acompanhar nesta dura jornada, saiba que sem você isso não seria possível..

O meu profundo agradecimento a Ana Paula, por todo seu carinho, dedicação e paciência, não só na reta final, mas em todos estes anos juntos no Bioex..

Agradeço ao professor Luiz Fernando pela oportunidade, a Micheli por inúmeras vezes zelar por minha saúde. O Rogério, sem palavras na minha primeira docência orientada, tua ajuda foi fundamental. A família Bioex, pelo apoio de sempre, principalmente pelo grupo de natação dos ratos, que por semanas o trabalho foi de segunda a segunda, mas não havia tempo ruim, a meta era alcançada... Maurinho, Luis, muito obrigado! e ao Fernando pelas orientações em EAD.

Obrigado de coração!!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Educação Física  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **Efeito profilático do treinamento aeróbico sobre marcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos após traumatismo cranioencefalico (TCE)**

Autor: Mauro Robson Torres de Castro  
Orientador: Luiz Fernando Freire Royes  
Local e data de defesa: Santa Maria, 8 de agosto de 2015

O exercício físico é capaz de gerar adaptações fisiológicas agudas e crônicas ao tecido, e apesar de inicialmente aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), é capaz de ativar a síntese de enzimas antioxidantes atenuando o estresse oxidativo. Seus efeitos vêm sendo estudado como opção terapêutica na prevenção e tratamento de isquemia cerebral, epilepsia, doença de Parkinson e traumatismo cranioencefálico (TCE) experimentais. O TCE além da lesão local primária pode interferir na função de múltiplos órgãos e sistemas metabolicamente ativos como o fígado causando disfunção hepática e exacerbando a lesão cerebral inicial. Neste contexto, conhecendo os inúmeros benefícios do exercício, especialmente sobre a função hepática frente diferentes patologias, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do treinamento físico prévio sobre os marcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos submetidos ao TCE. Para tal, o presente estudo utilizou ratos Wistar adultos machos submetidos ao TCE ou não, sendo divididos em quatro grupos separados aleatoriamente para realização do protocolo de natação cinco dias por semana durante seis semanas. Foi evidenciado que o exercício prévio de natação alterou o estado redox das células hepáticas, sendo capaz de proteger contra a diminuição nos níveis de GSH e aumento na oxidação do DCHF produzido pelo TCE 24 horas após a injúria neuronal. A análise estatística também revelou que o TCE induziu uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) e atividade das desidrogenases nas mitocôndrias (MTT) nos animais sedentários, sendo que esta diminuição não ocorreu nos animais treinados. O presente modelo experimental de TCE diminuiu a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em animais treinados quando comparado aos controles sedentários, aumentou o conteúdo de proteína carbonil e diminuiu a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase nos animais sedentários, o que foi atenuado pelo protocolo prévio de treinamento físico de natação. Já as análises bioquímicas das atividades das enzimas antioxidantes revelaram que o protocolo de natação atenuou o aumento da atividade da enzima SOD e protegeu da inibição da enzima catalase induzidas pelo TCE. A análise estatística revelou que o exercício físico bem como o TCE não alterou a expressão de Hsp70, Nrf2, níveis sérico de Aspartato-aminotransferase (AST), Alanina-aminotransferase (ALT) e lesão hepática quando analisado 24 horas após a injúria neuronal. A partir destes achados sugere-se que o nosso protocolo de natação apresenta efeitos protetores sobre a função mitocondrial e conseqüentemente na produção de EROS induzidas pelo TCE e, apesar das alterações oxidativas geradas pelo TCE no fígado não afetarem a viabilidade celular hepática, nossos dados experimentais traduz um novo fenótipo hepático que é mais suscetível às conseqüências deletérias associadas ao TCE.

**Palavras chave;** TCE, Estresse Oxidativo, Fígado, Treinamento Físico.

# ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Physical Education

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

## **Prophylactic effect aerobic training on markers of oxidative stress in the rats liver after Traumatic brain injury (TBI)**

AUTOR: MAURO ROBSON TORRES DE CASTRO

ADVISOR: LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES

Place and Date of Defense: Santa Maria, August, 8<sup>th</sup>, 2015.

Physical exercise can generate acute and chronic physiological adaptations to tissue, and although it initially increases the formation of reactive oxygen species (ROS), it is able to activate the synthesis of antioxidant enzymes attenuating oxidative stress and it has been studied as an option therapy in prevention and treatment of cerebral ischemia, epilepsy, Parkinson's disease and traumatic brain injury (TBI) experimental. TBI beyond the primary local injury may interfere on the multiple organs function and metabolically active systems such as the liver, causing liver dysfunction and exacerbating the initial brain injury. In this context, knowing the many benefits of exercise, especially on liver function across different pathologies, this study aimed to evaluate the effect of previous physical training on markers of oxidative stress in the liver of rats submitted to TBI. For this purpose, the present study used adult male Wistar rats subjected to TBI or not, they were divided randomly into four separate groups to perform of swimming protocol five days per week for six weeks. It was shown that prior swimming exercise changed the redox status of liver cells, able to protect against the decrease in GSH levels and it increased oxidation of DCHF produced by the TBI, on the 24 hours after neuronal injury. Statistical analysis also revealed that TBI induced a decrease in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) and activity of dehydrogenases in mitochondria (MTT) in sedentary animals. This effect was attenuated by the swimming protocol. This experimental model of TBI decreased the activity of the enzyme succinate dehydrogenase (SDH) in trained animals when compared to sedentary controls, increased protein carbonyl content and decreased the enzyme activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the inactive animals, which was attenuated by the previous protocol physical swimming training. Since the biochemical analysis of antioxidant enzyme activity revealed that the swimming protocol attenuated the increase in SOD enzyme activity and protected from inhibiting the enzyme catalase induced by the TBI. Statistical analysis showed that physical exercise as well as the TBI did not alter the expression of Hsp70, Nrf2, serum aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) and liver injury when analyzed 24 hours after neuronal injury. From these findings it is suggested that our swimming protocol has protective effects on mitochondrial function and result in the production of ROS induced by the TBI, and despite the oxidative changes generated by the TBI in the liver does not affect the hepatic cell viability, our experimental data translates a new liver phenotype that is more susceptible to the deleterious consequences associated to the TBI.

**Key words:** TCE, Oxidative Stress, Liver, Physical Training.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Enzima Catalase
CK	Enzima Creatina quinase
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
DAD	Dano Axonal Difuso
DCFH - DA	Diclorofluoreceína diacetato
DCF	2' - 7' - Diclorofluorecína
DMSO	Dimetil sulfosalicílico
DNPH	Dinitrofenil-hidrazina
ECG <sub>w</sub>	Escala de Coma de Glasgow
ER	Espécies reativas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
LPF	Lesão por percussão de fluido
GCL	γ-glutamil cisteín ligase
GCS	γ-glutamilcisteína sintetase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutatina oxidada
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso

INT	Cloreto de 2- [4-iodofenil]- 3 – [4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio
Mn-SOD	Manganês superóxido dismutase
MPO	Mieloperoxidase
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio)
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa $\beta$
Nrf2	Fator nuclear eritóide 2 relacionado ao fator 2
PGC-1 $\alpha$	Coativador 1 $\alpha$ do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PL	Peroxidação lipídica
RL	Radical livre
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TAD	Trauma axonal difuso
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TNF-a	Fator de necrose tumoral
Txr	Tiorredoxina redutase
$\Delta\Psi_m$	Potencial eletroquímico de membrana

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Escala de Coma de Glasgow.....	25
--	----

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.EXERCÍCIO FÍSICO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Histórico .....	15
1.2. Estresse Oxidativo .....	17
1.3. Estresse oxidativo e exercício físico aeróbio .....	18
1.4. Efeito do exercício físico no fígado .....	21
<b>2.TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)</b> .....	<b>22</b>
2.1 Conceito e Epidemiologia .....	22
2.2 Classificações do TCE .....	24
2.2.1 Gravidade da Lesão.....	24
2.2.2 Progressão da Lesão.....	26
2.2.3 Tipo de Impacto .....	27
2.2.4 Distribuição da Lesão .....	27
2.2.5 Trauma Axonal Difuso (TAD) .....	28
2.3. Fisiopatologia do TCE .....	29
2.3.1 Dano Primário.....	29
2.3.2. Dano Secundário .....	30
2.4 Resposta sistêmica ao TCE .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Objetivo Geral .....	32
3.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Animais .....	33
4.2 Desenho Experimental .....	34
4.3 Protocolo de Treinamento de Natação .....	34
4.4 Indução do Traumatismo Crânioencefálico.....	35

4.5 Obtenção do tecido .....	35
<b>5. ANÁLISE BIOQUÍMICA .....</b>	<b>36</b>
5.1. Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).....	36
5.2. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	36
5.3. Atividade da Desidrogenase mitocondrial (MTT) .....	37
5.4 Determinação da atividade da Succinato Desidrogenase.....	37
5.5 Grupo Carbonilinas (conteúdo total de proteínas carboniladas) .....	38
5.6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	38
5.7. Atividade da Enzima Catalase (CAT) .....	39
5.8 Atividade da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> - ATPase .....	39
5.9. Western blotting para determinação do conteúdo de Nrf2 e de proteína Hsp 70 .....	40
5.10 Determinações das Enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) Aspartato Aminotransferase (AST) .....	40
5.11Análise histológica.....	41
5.12 Quantificação da proteína .....	41
<b>6.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>41</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>



# INTRODUÇÃO

## 1. EXERCÍCIO FÍSICO

### 1.1 Histórico

A presença e a importância do exercício físico são percebidas desde o início da história da humanidade. Os relatos mais antigos de atividade física vêm da pré-história, quando já havia preocupação com um físico forte no intuito de proteção e subsistência (COSTA, 1998). O homem primitivo deslocava-se de um lugar para outro a procura de alimentos, subia em árvores, escalava penhascos, nadava, saltava e lançava suas armas de arremesso, demonstrando que o homem executava os seus movimentos corporais mais básicos e naturais desde que se colocou em pé (SILVA, 1998).

O exercício físico de caráter utilitário e sistematizado, também de forma rudimentar estava presente em diversas civilizações antigas como a Babilônia, a Pérsia, a Assíria, o Egito, o Oriente Médio, a Índia e a China através de jogos, rituais e festividades (RAMOS, 1982). Porém, foi na Grécia antiga, com a criação dos Jogos Olímpicos que a atividade física como treinamento físico para jogos de esporte, educação corporal e treinamento de exércitos começa a tomar importância (RAMOS, 1982).

Na Idade Média, com a queda do império romano e a ascensão do cristianismo ocorre uma estagnação no desenvolvimento do Exercício Físico, e este passa a ser usado apenas na preparação de soldados para guerra. Já na Idade Moderna, iniciam-se os estudos sobre fisiologia, anatomia, técnicas desportivas (RAMOS, 1982; MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003), bem como o estabelecimento de regras para realização de esportes (TUBINO & MOREIRA, 2003) e um grande impulso ocorre após a restauração dos Jogos Olímpicos e a criação do Comitê Olímpico Internacional em 1894 por Pierre de Coubertin.

O Esporte Contemporâneo se estabelece com a edição da carta Internacional de Educação Física e Esporte da UNESCO. Esse documento divide a prática esportiva em Esporte-Educação, Esporte-Lazer e Esporte de rendimento (TUBINO & MOREIRA, 2003). Atualmente, a prática regular de exercícios físicos

moderados está bem consolidada na sociedade como um todo em consequência do seu grande leque de benefícios à saúde (NIEMAN, 2003; GLEESON, 2007). Dentre os diversos benefícios do exercício físico para saúde, pode-se destacar a melhora do humor (TALL, 2002), no funcionamento cardiovascular (POWELL; PAFFENBARGER, 1985; BOOTH; CHAKRAVARTHY; SPANGENBURG, 2002), e alterações metabólicas características de doenças crônicas como diabetes melittus e obesidade (PEDERSEN & SALTIN, 2006, BLAIR et al., 2001). Trabalhos epidemiológicos também demonstram redução dos riscos para desenvolvimento de tipos específicos de cânceres (WARBURTON et al., 2006), bem como menores índices de mortalidade em doenças cardiovasculares (TOPOL, 2005). Devido a seus efeitos protetores, o exercício vem sendo utilizado como medida terapêutica, considerada, em alguns casos, como tratamento de primeira escolha em diversas doenças crônicas (GUALANO et al., 2011).

Vários mecanismos biológicos podem ser responsáveis pelos benefícios do exercício físico regular. Alguns estudos têm mostrado uma melhora no perfil lipídico (diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol) (BERG, HALLE, FRANZ et al., 1997), melhora a homeostase da glicose, aumento na sensibilidade a insulina (WALLBERG HENRIKSSON et al., 1998), ação anti-inflamatória sistêmica e central (ADAMOPOULOS, PARISSIS, KROUPIS, et al., 2001), redução da pressão arterial (BLAIR, GOODYEAR, GIBBONS et al., 1993), aumento das defesas antioxidantes endógenas (JI et al., 1997, KARABULUT et al., 2013), secreção de fatores de crescimento no cérebro e na periferia alterações no perfil hormonal e na liberação de neurotransmissores (OTA and DUMAN, 2013).

A maioria dos mecanismos propostos para os benefícios do exercício físico concentra-se nas adaptações crônicas desencadeadas por perturbações da homeostase decorrentes das sessões individuais de exercício. Uma importante perturbação desencadeadora de adaptações é a produção de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o exercício (POLIDORI et al., 2000). Neste contexto, da mesma forma que o exercício físico traz benefício para a saúde, também é responsável em aumentar o consumo de oxigênio e, também a geração de ERO (BOVERIS & NAVARRO, 2008). Entretanto, o aumento da síntese de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (HIGUCHI et al., 1985;

LEEUWENBURGH et al., 1997), catalase (CAT) (QUINTANILHA, 1984; OH-ISHI et al., 1997) e glutathione peroxidase (GPX) (JI et al., 1985; JI et al., 1998) induzidos pelo treinamento físico constitui-se em uma adaptação metabólica capaz de proteger as células e tecidos do estresse oxidativo gerados pelo próprio exercício físico (BANERJEE, 2003).

## 1.2. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo se estabelece quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante em um organismo, com uma preponderância na produção de moléculas pró-oxidantes, como as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (FUKAGAWA, 1999).

As EROs são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, principalmente em nível mitocondrial. Apesar de potencialmente tóxicas, estas EROs são fundamentais para diversos processos celulares, como defesa imunológica e sinalização celular (MONCADA, HIGGS, 2001). Entretanto, a produção em excesso destas moléculas pode causar danos nos constituintes celulares, constituindo-se assim como um possível mecanismo de dano em quadros patológicos (AMES et al., 1993).

As principais espécies reativas (ERs) incluem o radical superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Entre as ERNs podemos citar o peróxinitrito e o óxido nítrico. Estas espécies podem ser produzidas endogenamente através da atividade catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (FINKEI, TOREN and NIKKI, 2000). Essas ERs também podem ter origem exógena pela exposição aos raios UV, radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos (VASCONSELOS et al., 2007, CERUTTI, 1991).

O efeito nocivo destas moléculas reside em sua forte capacidade de extrair elétrons de moléculas endógenas, sendo, desta forma, responsáveis pela lesão de diversos componentes das estruturas celulares (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 1999). Os componentes mais suscetíveis ao “ataque” das ERs são os lipídios de membrana, as proteínas, o DNA nuclear e também o DNA mitocondrial. Em alguns

casos, a produção elevada de ERs pode causar alterações na função mitocondrial levando a um declínio na produção energética e maior produção de espécies reativas, o que pode resultar em importante disfunção celular (BENARD and ROSSIGNOL, 2008).

A fim de limitar os níveis intracelulares de radicais livres e impedir a indução de danos celulares, o organismo desenvolveu mecanismos de defesa antioxidantes que agem por meio de uma série de enzimas e moléculas capazes de combater a propagação e os danos causados pelas ER (WAGNER et al., 1993). O sistema antioxidante pode ter fonte endógena como as enzimas que atuam na mitocôndria, destacando-se a SOD, glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSH), GPx e glutathiona redutase (GR), CAT e tiorredoxina redutase (Txr); ou exógenas pela alimentação ou suplementação com vitaminas antioxidantes (VASCONSELOS et al., 2007, MICHIELS et al., 1994).

### 1.3. Estresse oxidativo e exercício físico aeróbio

A prática de exercícios físicos predominantemente aeróbios está associada a danos celulares acarretados pela produção de radicais livres, dentre os quais se destaca a lesão da membrana celular, representada pelo aumento no extravasamento da enzima citosólica creatina quinase (CK) para o plasma durante o esforço. Estudos envolvendo esforços físicos até exaustão em esteira aumentaram significativamente as concentrações de CK plasmática imediatamente após a exaustão em ratos (~137%) em ratos, e três (~74%), 24 (~219%) e 48 h (~129%) após teste incremental até a exaustão, seguido por 15 min de corrida a 110% do limiar anaeróbio individual, previamente determinado, em humanos (NIESS et al., 2002). O estresse celular, indicado pelas concentrações plasmáticas de CK, pode provocar danos, atraindo células inflamatórias. Apesar das quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidas por células inflamatórias serem insuficientes para induzirem uma alteração celular significativa, os neutrófilos contêm em seus grânulos azurófilos a enzima mieloperoxidase (MPO) que, na presença de íon cloreto (Cl<sup>-</sup>), converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso (HOCl), que também induz lesão oxidativa. De fato, estudos desenvolvidos por Suzuki e colaboradores (2003) revelaram aumentos significativos

na atividade de MPO, tanto no plasma (~duas vezes) quanto na urina (~12 vezes), após uma corrida de maratona. Este aumento da atividade de MPO após exercício exaustivo parece ser sistêmico, uma vez que Belcastro e colaboradores (1996) verificaram elevação significativa, também, em outros locais como fígado (~40%), coração (~51%) e músculo gastrocnêmio (~41%).

Neste sentido, o mecanismo pelo qual o exercício pode desencadear o aumento das ERs está embasado na premissa de que o exercício aumenta o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias e, assim, provoca um aumento da formação de radicais livres por estas organelas. Isto ocorre porque 2-5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria é univalentemente reduzido, formando o radical superóxido durante atividade mitocondrial. Assim, um aumento da atividade desta organela durante exercício físico leva a uma maior produção do superóxido (BLOOMER, 2008) o qual inicia as reações oxidativas em cascata que levam a formação de outras ERs potencialmente mais danosas. Cabe salientar a existência de outras fontes produtoras ER durante o exercício. A atividade aumentada da enzima xantina oxidase é uma delas (CABRERA et al., 2003). Considerando que a fonte de energia para o trabalho muscular é o ATP, o aumento de sua degradação durante o exercício físico eleva as concentrações de  $Ca^{+2}$  intracelular o que, por sua vez, ativa proteases dependentes de  $Ca^{+2}$ , que regulam a proteólise parcial da xantina desidrogenase, convertendo-a a sua forma oxidase. A Xantina oxidase resultante utiliza o oxigênio molecular como aceptor de elétrons, reduzindo-o a ânion superóxido (SJÖDIN et al., 1997). Portanto, o mecanismo da Xantina oxidase parece ser uma importante via de produção de ERO durante exercício físico progressivo. De fato, Hellsten e colaboradores (1996) encontraram aumento significativo na imunorreatividade de Xantina oxidase, no músculo esquelético, uma hora após submeterem, durante uma semana, militares a 150 km de marcha com aproximadamente 30 kg de equipamentos. Aumento similar foi verificado por Radák e colaboradores (1996), em ratos, imediatamente após teste até exaustão em esteira, retornando aos valores de repouso 24 h mais tarde. Um importante meio para se evitar possíveis lesões oxidativas a estruturas celulares decorrentes do exercício físico é o aumento na atividade de enzimas catalisadoras de reações que neutralizam radicais livres.

Neste sentido, o exercício físico regular pode tornar o sistema de defesa antioxidante mais eficiente, possibilitando a manutenção um equilíbrio redox em condições oxidantes posteriores (LIU et al., 2000, CARMELI et al., 2000). De fato, inúmeros estudos clínicos e experimentais realizados em diferentes órgãos e/ou tecidos têm corroborado essa idéia. Ji et al (2007), demonstraram que, agudamente, o músculo esquelético submetido a uma carga isolada de trabalho exaustivo produz um aumento da peroxidação lipídica (PL) e um aumento na atividade de diversas enzimas antioxidantes como GPx, SOD e CAT. Outro estudo realizado com ratos submetidos ao treinamento de natação acrescenta uma resposta adaptativa caracterizada pelo aumento do conteúdo de GSH e diminuição da peroxidação lipídica de mitocôndrias em fígado (LIMA et al., 2013). Da mesma forma, estudos realizados em amostras de sangue de corredores adolescentes, revelaram um aumento da atividade da CAT e nos níveis de GSH durante o período de recuperação inicial (TIAN et al., 2013).

Estes efeitos antioxidantes parecem ser mediados pelas sessões de treinamento que levam a ativação de fatores de transcrição com atividade redox sensível como: o *Nuclear erythroid 2 factor 2* (Nrf2) (MUTHUSAMY et al., 2012) e o fator nuclear kappa B (NF-κB) (BUBICI et al., 2006). Entre as enzimas reguladas por estes fatores temos: γ-glutamil cisteine ligase (GCL), GP, GR, catalase, MnSOD, γ-glutamilcisteina sintetase (GCS) (GOMEZ-CABRERA et al., 2008).

Outra adaptação benéfica do exercício físico é a biogênese mitocondrial. Está bem estabelecido na literatura que diferentes tipos de exercício físico aumentam a expressão do *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha* PGC-1α (BAARK et al., 2002), um importante indutor da biogênese mitocondrial (UGUCCIONI et al., 2011), cuja expressão é regulada por proteínas cinases também induzidas pelo exercício em tecido muscular (POGOZELSKI et al., 2009; AKIMOTO et al., 2005). Estudos recentes também têm mostrado que a produção de ERs durante as sessões de exercício estimula a expressão do PGC-1α, (VENDITTI et al., 2014; KANG et al., 2009) e conseqüentemente a biogênese mitocondrial em tecido muscular de roedores. Além disso, o exercício parece aumentar não só o número de organelas, mas também melhora a função/eficiência da rede mitocondrial. Esta melhoria funcional

provavelmente resulta do aumento das taxas de biogênese mitocondrial e da remoção eficiente das mitocôndrias danificadas/não-funcionais (KRIEGER et al., 1989). Estas alterações provavelmente levam a uma síntese de ATP mais eficiente e uma menor produção de ER pelas mitocôndrias. Este pode ser um dos mecanismos protetores do exercício nos diferentes tecidos.

#### 1.4. Papel do exercício físico no fígado

O fígado é um órgão metabólico que possui uma ampla variedade de funções, incluindo a desintoxicação de fármacos e xenobióticos, a síntese de proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação, inflamação e controle da pressão arterial (MICHALOPOULOS, 2007). Também tem função na produção de compostos bioquímicos necessários para a digestão de gorduras, bem como o controle metabólico do suprimento plasmático de moléculas energéticas (JUNQUEIRA, CARNEIRO; 2004). Em consequência da importância destas funções para homeostase do organismo, disfunções hepáticas podem causar problemas de coagulação, de controle de glicemia, dislipidemias e, em casos graves, até encefalopatias (BEGRICHE et al., 2011). Neste contexto, intervenções hepatoprotetoras têm impulsionado o estudo do efeito do treinamento aeróbico sobre o fígado nos últimos anos (CHAPADOS et al., 2009).

Neste contexto, os modelos animais, em particular roedores, são amplamente utilizados para investigar os mecanismos moleculares regulados por intervenções de exercício ou de treinamento agudos. Semelhante a estudos em humanos, a maioria dos estudos dedicaram-se ao músculo esquelético. Alguns grupos investigaram os efeitos do treinamento físico de longo prazo sob a expressão hepática em roedores (AOI et al., 2004; COLOMBO et al., 2005; FIEBIG et al., 2002), na sua maioria realizados em animais obesos ou com hiperglicemia. Estes estudos fornecem evidências não somente sobre a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo hepático da glicose e lipídios, mas também para expressão alterada de moléculas de sinalização, tais como quinases e fatores de transcrição e proteínas envolvidas na defesa antioxidante. De fato, o treinamento físico de cunho aeróbico em roedores obesos ou hipoglicêmicos, além de restaurar os níveis das enzimas da

glicólise, da gliconeogênese e da oxidação dos ácidos graxos (HOENE et al., 2009), também aumenta a expressão de enzimas como a SOD e a CAT (AOI et al., 2004; COLOMBO et al., 2005; FIEBIG et al., 2002; LEE et al., 2006; WILSON and JOHNSON, 2000). O exercício moderado também reduz o aumento de estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento, bem como evita a redução da atividade enzimática do complexo IV da cadeia respiratória em mitocôndrias hepáticas (NAVARRO et al., 2004). Finalmente, o exercício físico também é capaz de restaurar o aumento de marcadores inflamatórios (fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-1 $\beta$ , atividade da mieloperoxidase e apoptose dependente de mitocôndria) induzidos por fumo ou esteatose não alcoólica (KURU et al., 2015). Juntos, estes estudos corroboram o efeito protetor do exercício físico sobre os hepatócitos em diferentes condições patológicas.

## **2.TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)**

### **2.1 Conceito e Epidemiologia**

O traumatismo cranioencefálico (TCE) constitui um problema de saúde pública que afeta mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo (ZITNAY, 2005), sendo também considerado uma das principais causas de morte entre crianças e jovens adultos em países industrializados (BAKER et al., 2008). Por definição, o TCE é considerado uma agressão ao cérebro causada por uma força física externa, que pode produzir um estado diminuído ou alterado de consciência, que resulta em comprometimento das habilidades cognitivas ou físicas, podendo causar distúrbios comportamentais ou emocionais temporários ou permanentes (SMITH & WINKLER, 1994). Desta forma, o TCE pode ser considerado como uma epidemia silenciosa que afeta profundamente as pessoas que o sofrem, seus familiares e toda a sociedade. Quem sobrevive a este evento pode apresentar deficiências e incapacidades temporárias ou permanentes, interferindo na capacidade destes indivíduos para desempenhar suas funções diárias, laborais e de participarem ativamente da sociedade (SILVER et al., 2005; ATKIN et al., 2009).

A cada ano, nos Estados Unidos (KLUGHERZ et al.), mais de três milhões de pessoas sofrem TCE e os déficits psicossociais e psicológicos são as principais fontes de incapacidade para estas pessoas (SILVER et al., 2005). Além disso, nesta população, o TCE é uma das principais causas de morte por lesão, e indivíduos de todas as idades, raças/etnias e de todos os níveis socioeconômico são afetadas (CORONADO, 2009). Segundo dados do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention - CDC), durante 2002 e 2006, cerca de 1,7 milhões de pessoas nos EUA sofreram TCE, destes indivíduos, aproximadamente 52 mil morrem, 275 mil foram hospitalizadas, e cerca de 1,4 milhões foram tratados e liberados de um serviço de emergência (FUAL et al., 2007). Os dados epidemiológicos ainda mostram que indivíduos masculinos (SILVER et al., 2005) na faixa etária de 15 a 24 anos de idade e os indivíduos mais velhos, acima de 64 anos de idade, são considerados a população com maior risco de sofrer um TCE. Cabe salientar que nos Estados Unidos as principais causas do TCE são: as quedas (35%), seguidas dos acidentes automobilísticos (17%), dos acidentes de trabalho ou em decorrência da prática de esportes (16,5%), dos assaltos (10%) e de outras causas desconhecidas (21%) (FAUL et al., 2010).

Alguns estudos também têm demonstrado o montante gasto com pacientes que sofrem este tipo de lesão encefálica. Max e colaboradores (1990) fizeram as primeiras estimativas sobre os custos do TCE nos EUA e, interessadamente, mostraram que os valores despendidos com o TCE leve e grave por paciente em 1985 foram muito próximos. Em 2006, outro estudo revelou que o custo total dos norte americanos, no ano de 2000, com pessoas vítimas de lesões encefálicas foi cerca de \$406 bilhões; sendo deste total, \$80 bilhões gastos com tratamento médico e \$326 bilhões referentes à perda da produtividade desses indivíduos (CORSO et al., 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos acerca do TCE são muito escassos, além de serem um pouco desatualizados, segmentados por regiões muito específicas e por apresentarem muitas diferenças metodológicas. Porém, levantamentos de dados sobre este tipo de lesão encefálica são necessários para que se possa avaliar e planejar estratégias de prevenção e intervenção que sejam mais efetivas (CORONADO et al., 2012). Desse modo, é importante compreender a maneira pela

qual as informações são obtidas nestes estudos, para que os resultados possam ser comparados e para que estes dados se tornem mais fidedignos a realidade do TCE (SILVER et al., 2005).

## **2.2 Classificações do TCE**

Para melhor compreensão, o TCE pode ser classificado de acordo com a gravidade, progressão e distribuição da lesão bem como o tipo de impacto (SILVER et al., 2005)

### **2.2.1 Gravidade da Lesão**

No princípio, consideravam-se muito as características clínicas para determinar e estratificar a gravidade da lesão do TCE. Neste contexto, a injúria neuronal era considerado como leve, moderada ou grave, levando em consideração a presença e o tipo de ferimento, a ocorrência ou não de fratura de crânio, hematomas cerebrais, além de considerar também o tempo de inconsciência e de amnésia pós-traumática nesta avaliação (ANNEGERS et al., 1980). No entanto, ao longo dos anos, alguns autores propuseram que tanto a perda de consciência como a amnésia não devem ser consideradas como bons parâmetros para classificar a gravidade do trauma, visto que, nem sempre estão associados às lesões encefálicas (FREY, 2003).

Dessa maneira, tem sido proposto o uso de outros métodos, como a utilização de exames de imagem para diagnóstico na identificação da gravidade da lesão encefálica do TCE, juntamente com técnicas de avaliações mais rápidas e que não necessitem de muitos recursos, mas que sejam fidedignas e consigam mostrar a severidade da lesão (MAAS et al., 2008). Clinicamente, é de extrema importância que se consiga estimar de forma rápida a extensão e a severidade da lesão do TCE, para que sejam realizados os procedimentos e condutas adequadas aos pacientes logo no momento inicial da chegada ao serviço de atendimento. Neste contexto, a Escala de Coma de Glasgow (ECG<sub>w</sub>; Tabela 1) tem sido muito aceita e utilizada na clínica, como triagem para avaliação da gravidade inicial da lesão do TCE no momento da admissão do paciente ao atendimento médico (SAATMAN et al., 2008).

A presente escala foi proposta por Teasdale e Jennett (1974) como forma de avaliar a duração e a profundidade das alterações de consciência e do coma, levando em consideração três manifestações comportamentais, que são: resposta motora, resposta verbal e resposta de abertura ocular (TEASDALE and JENNETT, 1974). O responsável pelo atendimento inicial do paciente realiza a avaliação da gravidade do TCE atribuindo escores a cada um dos quesitos considerados na ECG<sub>w</sub> e, assim, o TCE é classificado como leve (quando este escore varia entre 13 e 15), moderado (quando varia de 9 a 12) e grave (quando o escore fica abaixo de 9) (SAATMAN et al., 2008).

Embora a ECG<sub>w</sub> seja amplamente utilizada e apresente informações consistentes para determinação inicial da gravidade do TCE, esta apresenta algumas limitações na sua utilização com determinados pacientes. Em alguns casos, ela acaba sendo difícil de ser aplicada, como em avaliações de crianças, pacientes com edema facial em decorrência do trauma, pacientes sob a influência de álcool ou de outras substâncias, e de pacientes incapazes de responder ao componente verbal por causa de diferenças de linguagem (SILVER et al., 2005; MAAS et al., 2010). Porém, mesmo apresentando certas limitações e restrições, a ECG<sub>w</sub> ainda é uma das ferramentas mais utilizadas para mensurar inicialmente a gravidade da lesão cerebral (SILVER et al., 2005).

Escala de Coma de Glasgow		
Melhor resposta visual (O)	Espontânea	4
	ao falar	3
	ao sentir dor	2
	olhos sempre fechados	1
Melhor resposta motora		
(M)	Obedecer	6
	Localizar	5
	reflexo de retirarada	4
	flexão anormal	3

	resposta extensora	2
	sem resposta motora	1
<hr/>		
Melhor resposta verbal (V)	Orientada	5
	conversa confusa	4
	palavras inapropriadas	3
	sons incompreensíveis	2
	sem resposta verbal	1
Escore de coma= (O+M+V)		
<hr/>		

Tabela 1- Escala de Coma de Glasgow. Escala amplamente utilizada para avaliar a gravidade inicial do TCE (Adaptada de SILVER et al.2005.)

### 2.2.2 Progressão da Lesão

Inicialmente, a determinação da gravidade das lesões do TCE baseava-se em dados clínicos. Desta forma, se o paciente estivesse consciente e conseguisse se comunicar facilmente após o trauma estimava-se que a lesão havia sido leve (SILVER et al., 2005). No entanto, em 1975, Reilly e colaboradores relataram que alguns pacientes, vítimas de TCE, tinham ótima capacidade de se comunicar após a lesão, no entanto, alguns destes apresentavam complicações e um agravamento do quadro da lesão que muitas vezes vinham a óbito ou apresentavam incapacidade permanente (REILLY et al., 1975).

A partir de então, as lesões decorrentes do TCE passaram a ser classificadas como dano primário e dano secundário. O dano primário é entendido como o resultado das forças mecânicas que atuam para provocar o ferimento encefálico, já o dano secundário, abrange todas as alterações biomoleculares e fisiológicas que acontecem em consequência ao dano primário, podendo estas ser prolongadas e progressivas (SILVER et al., 2005; RAY, 2002).

### 2.2.3 Tipo de Impacto

O entendimento dos mecanismos que podem gerar a lesão encefálica do TCE é importante para compreender de que maneira determinadas forças podem desencadear diferentes tipos de lesões. As circunstâncias nas quais um evento de TCE pode ocorrer são diversas e complexas e, portanto, a compreensão dos mecanismos que podem gerar este tipo de lesão torna-se relevante. Neste sentido, foram determinados dois mecanismos principais de lesão cerebral que são: dano por contato e dano por aceleração/desaceleração (NORTJE; MENON, 2004, Silver et al., 2005).

O dano por contato compreende as lesões que ocorrem em condições nas quais um objeto atinge a cabeça ou a mesma é atingida por um objeto ou ainda, quando há contato entre o encéfalo e o crânio, gerando normalmente lesões mais localizadas. Por outro lado, o dano por aceleração/desaceleração ocorre quando há ação de forças externas resultando no movimento irrestrito da cabeça, fazendo com que o cérebro movimente-se dentro do crânio chocando-se contra o mesmo, levando a geração de uma força de cisalhamento e compressão, resultando geralmente em hematomas subdurais e em danos aos axônios (SAATMAN et al., 2008, SILVER et al., 2005).

### 2.2.4 Distribuição da Lesão

Com base no diagnóstico clínico e radiológico, a lesão encefálica pode ser classificada por sua distribuição de duas maneiras; como dano focal ou como dano difuso (GRAHAM et al. 2002). O dano focal é caracterizado por lesões que se restringem a uma única porção do encéfalo e resultam mais frequentemente de traumas causados por contato. Ainda, de acordo com Gennarelli & Graham (2005), as injúrias focais incluem hematomas epi e subdurais, contusões, lacerações e fraturas do crânio (GENNARELLI & GRAHAM, 2005)

Por outro lado, o dano difuso compreende as lesões que se distribuem de forma mais generalizada pelo encéfalo, são considerados danos multifocais, tendo frequentemente como principal consequência o dano axonal difuso (DAD). Este tipo de lesão é geralmente causado por mecanismos traumáticos por aceleração/desaceleração (SILVER et al., 2005).

### 2.2.5 Trauma Axonal Difuso (TAD)

O trauma axonal difuso (TAD) compreende o conjunto de patologias axonais causadas pelo trauma que levam ao rompimento dos axônios neuronais. O TAD pode ser causado por um dano focal ou difuso ao encéfalo e não é limitado ao momento do impacto, podendo prolongar-se por um longo período desde a lesão inicial (MAXWELL et al., 2003). Além disso, diferente do que se acreditava anteriormente, este tipo de dano não é uma característica exclusiva do trauma grave, sendo também observado no trauma mais leve ao trauma grave (BLUMBERGS et al., 1995). Dentre as principais alterações axonais provocadas pelo TAD podemos citar o edema axolemal, as alterações e o bloqueio do transporte axonal, a alterações no citoesqueleto consistindo na compactação do neurofilamentos e a perda da rede de microtúbulos (OKONKWO E POVLISHOCK, 1999, ).

Ao longo dos anos, algumas teorias sobre os mecanismos pelos quais o trauma inicia o processo de degeneração axonal vêm sendo propostas. Uma das teorias sugere que o estiramento físico no momento da lesão resulta em dano ao axolema provocando alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, fazendo com que os axônios percam a capacidade de manter a homeostase iônica resultando em mudanças nas concentrações de íons como cálcio, potássio, sódio e cloreto dentro do axoplasma (PETTUS et al., 1994, SILVER et al., 2005). Em certas fibras, estas alterações na homeostase iônica podem ativar determinadas proteases que por sua vez, desnaturam o citoesqueleto dos axônios (GENNARELLI, 1996). No entanto, esta hipótese não foi totalmente aceita (SMITH et al., 1999) surgindo em seguida, uma segunda teoria para o TAD, a qual sugere que o TCE pode

mecanicamente ou funcionalmente, danificar os neurofilamentos, prejudicando e interrompendo o transporte axoplasmático (STONE et al., 2000).

Alguns achados experimentais demonstraram que o TAD induz o aparecimento de uma série de alterações histológicas, as quais dependem do tempo de sobrevivência do paciente após o trauma, o que permite melhor identificar a progressão da lesão. Nos indivíduos que sobrevivem por pouco tempo, as lesões aparecem de forma hemorrágica, mas com o tempo resultam no encolhimento dos axônios com a formação de cicatrizes císticas. Por outro lado, pacientes que sobrevivem por um período maior, o edema axonal é facilmente verificado em colorações por prata, hematoxilina e eosina (H&E) e através de métodos imunohistoquímicos (SHERIFF et al., 1994). Embora estes estudos histológicos sejam somente realizáveis após a morte dos pacientes, exames de imagem estão sendo muito utilizados com o objetivo de fornecer melhores diagnósticos sobre a lesão gerada pelo TAD (PINEDA et al., 2007).

### **2.3. Fisiopatologia do TCE**

#### **2.3.1 Dano Primário**

O TCE é decorrente da ação de forças mecânicas externas que agem gerando um impacto ao crânio e, conseqüentemente este impacto pode provocar lesões à estrutura cerebral. Portanto, o dano primário compreende estas lesões que ocorrem imediatamente ao impacto (STIVER e MANLEY, 2008; Ray, 2002). Este impacto causa lesões a partir de dois mecanismos, que são: lesão por contato e lesão por forças inerciais.

Estes dois tipos de lesão podem levar a padrões distintos de ferimentos caracterizados por dano focal e por dano difuso. Assim, lesões por contato causam primariamente ferimentos como fratura de crânio, hematoma epi e subdural, além de ferimentos ao escalpo. Por outro lado, forças inerciais levam a hematomas intracerebrais e subdurais, além de dano axonal difuso (GRAHAM et al., 1995).

### 2.3.2. Dano Secundário

Subsequente ao dano primário ocorre uma série de alterações progressivas a nível molecular, que compreendem o dano secundário (SILVER et al., 2005). Esses eventos moleculares que se iniciam no momento do impacto podem desenvolver-se durante horas, meses a anos. O dano secundário, normalmente inclui o edema cerebral, o aumento da pressão intracraniana, dano cerebral hipóxico e ou isquêmico, excitotoxicidade, estresse oxidativo, resposta inflamatória, apoptose e disfunção metabólica (VINK et al., 2003; WERNER & ENGELHARD, 2007). No entanto, diferente ao dano primário, os mecanismos que levam ao dano secundário são potencialmente passíveis de intervenção terapêutica devido a sua progressão mais lenta, por isso, na maioria das vezes, são alvos no desenvolvimento de estratégias de tratamento das seqüelas causadas pelo TCE (RAY, 2002).

## 2.4 Resposta sistêmica ao TCE

A elevada incidência do (TCE) observada nas últimas décadas, com alta taxa de mortalidade e elevada permanência hospitalar, comparados a traumatismos em outros órgãos e sistemas, levaram a um crescente interesse no estudo das peculiaridades do trauma encefálico. Na década de 90, autores como Hackl e colaboradores (1991) sugeririam que "o prognóstico de pacientes com trauma cranioencefálico severo, seria devido mais à hipertensão intracraniana e distúrbios metabólicos adjacentes, do que propriamente aos cuidados terapêuticos usuais e medidas gerais de reabilitação". Neste contexto, a resposta inflamatória e neuroendocrinológica que se segue à lesão encefálica teria sua expressão limitada às duas primeiras semanas após o trauma (ANTHONY and COUCH, 2014). Dentre as alterações mais marcantes está a hiperglicemia, associada diretamente ao prognóstico do trauma (ROSTAMI, 2014).

No que se refere ao metabolismo protéico-energético, Young e colaboradores (1981) demonstraram que as proteínas de fase aguda tendem à normalização passadas duas semanas após o TCE. Cabe salientar que as proteínas de fase

aguda, assim como a glicemia, apresentam razoável correlação com a evolução neurológica após TCE. Esta visualização global confirma as impressões de Deutshman e colaboradores de que o trauma encefálico fechado, diferentemente das lesões que não comprometem o crânio, tem a resposta hipermetabólica restrita às primeiras duas semanas do período de recuperação, independentemente da gravidade e localização das lesões. A justificativa para esta periodicidade pode estar ligada a distintos fatores. As respostas neuroendocrinológicas mediadas pelo eixo hipotálamo-hipofisiário-adrenal estão associadas a mecanismos de "feed-back", que ocorrem em vários níveis. Desta forma, é possível propor que as reações ao estresse têm diferentes graus de especificidade, podendo ser adequadas ou não para a manutenção da homeostase.

Entretanto, a pergunta que se coloca é a de que se a resposta sistêmica é ou não apropriada; e no caso de ela ser adequada, se é exagerada ou não. A elucidação dos fatores e mecanismos que regulam a manutenção desta resposta sistêmica é essencial na abordagem terapêutica do TCE. Neste contexto, alguns autores ainda consideram o TCE como uma doença multissistêmica, que interfere com a função de múltiplos órgãos e sistemas, mesmo aqueles que não estão diretamente relacionados com o local do impacto inicial (MAZZEO et al., 2006). De fato, alterações histopatológicas em órgãos como pulmão, fígado e timo foram observadas após TCE experimental em camundongos (MIRZAYAN et al., 2008). Da mesma forma, Charrueau e colaboradores (2009) demonstraram que ratos submetidos ao TCE apresentam uma diminuição no conteúdo de albumina (proteína de origem hepática) plasmática e uma redução do peso de vários órgãos, alterações estas que não estão ligadas a deficiências nutricionais. Aumentos nos níveis plasmáticos e marcadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, proteína C reativa e número de neutrófilos circulantes ativos também foram detectados em pacientes com TCE isolado previamente saudáveis, indicando a presença de uma inflamação sistêmica.

Ademais, o fígado por ser um órgão multifuncional também tem sido alvo de raras pesquisas que objetivam avaliar suas condições após lesões encefálicas. Neste contexto, um aumento da atividade sérica da alanina aminotransferase e

fosfatase alcalina (enzimas utilizadas para avaliar o fígado), e uma elevação da peroxidação lipídica em eritrócitos foram observadas em seres humanos que sofreram lesão cerebral (KASPRZAK et al., 2001). Moinard et al (2005) também demonstrou que o peso do fígado e o conteúdo de proteína hepática diminuíram (28% e 48% respectivamente) num modelo de lesão cerebral produzido por percussão de fluido lateral em ratos. Em outros trabalhos, o TCE também causou perda da massa total de nitrogênio (YOUNG et al., 1985; MOINARD et al., 2005), aumento da síntese de proteínas de fase aguda (MANSOOR et al., 2007) e comprometimento da homeostase energética do fígado caracterizada por diminuição nos níveis de glicogênio hepático e ATP (MOINARD et al., 2008).

Embora alguns estudos mostrem a existência de alterações em órgãos como fígado, a maioria dos estudos disponíveis investiga apenas alterações encefálicas decorrentes do TCE, deixando uma lacuna de conhecimento no que diz respeito às disfunções simultâneas dos órgãos periféricos. A preocupação com estes efeitos do TCE torna-se ainda mais importante se tivermos em mente que as alterações sistêmicas podem exacerbar as lesões cerebrais e que uma boa parte dos doadores de órgãos apresenta morte cerebral em consequência do TCE. Sabendo dos inúmeros benefícios do exercício sobre a saúde e especialmente sobre a função hepática frente diferentes patologias, torna-se relevante o estudo dos efeitos do TCE e do exercício sobre a função hepática.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do treinamento físico prévio sobre os marcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos submetidos ao TCE

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1) Determinar o efeito agudo do TCE nos parâmetros de estresse oxidativo, estado redox e homeostase mitocondrial nas células hepáticas de ratos;

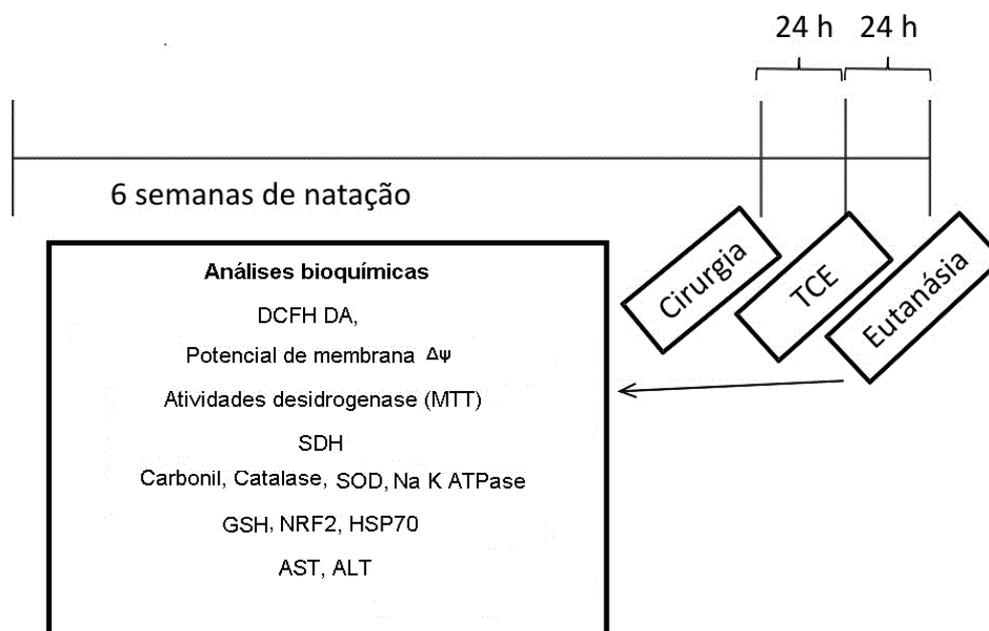
- 2) Investigar se possíveis alterações oxidativas induzidas pelo TCE alteram a atividade de enzimas alvo como a Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>-ATPase;
- 3) Determinar o efeito agudo do TCE na viabilidade celular hepática;
- 4) Determinar se possíveis adaptações no estado redox de células hepáticas induzidas pelo exercício físico prévio pode exercer efeito profilático neste modelo experimental de TCE.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Neste estudo foram utilizados 152 ratos Wistars machos pesando em torno de 250-300 g, os animais advindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) foram recebidos, ambientados e alojados em caixas em local apropriado e climatizado. Os animais foram mantidos sobre condições adequadas com livre acesso à comida em um ciclo de iluminação apropriado claro/escuro (12/12 hs), em uma temperatura  $24 \pm 1$  °C, e a umidade relativa do ar em torno de 55%). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com aprovação da Comissão de ética em uso animal da UFSM.

## 4.2 Desenho Experimental



### 3.2 Protocolo do Treinamento de Natação

Os animais foram separados em grupos de 10 animais, onde um grupo foi destinado para o treinamento físico aeróbio e o outro constituiu o grupo controle, os animais sedentários. Sendo assim, o período de treinamento teve duração de seis semanas com sessões diárias de 60 minutos, cinco vezes por semana. Os tanques de treinamento utilizados para este estudo continham 80 cm de comprimento, 50 cm de largura e 90 cm de profundidade.

As sessões de natação eram realizadas sempre em água a uma temperatura de 32°C, sempre no período da manhã 09h00min-11h00min. Durante a primeira semana de treinamento, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação de natação sem pesos. Já nos animais do grupo controle, a adaptação foi realizada por meio do manuseio por humanos. Após o período de adaptação da natação, os ratos foram submetidos ao treinamento de natação com uma carga de trabalho 5% do peso corporal (Gobatto et al., 2001). As mochilas onde continham a sobrecarga eram ajustadas todas as semanas antes do reinício das sessões, com a finalidade de assegurar a manutenção da % citada anteriormente. Vinte e quatro

horas (24 h) após a última sessão de treinamento os animais foram submetidos à cirurgia para modelo de lesão percussão fluido (FPI), resultando em 4 grupos: sedentários / sham, sedentários / FPI, exercício / simulacro e exercício / FPI.

### **3.3 Indução do Traumatismo Crânioencefálico**

Vinte e quatro horas (24) após a última sessão de natação os animais foram preparados para o procedimento cirúrgico, os mesmos foram anestesiados com uma única injeção intraperitoneal (ip) de equitesina (6 ml/kg), uma mistura contendo pentobarbital sódico (58 ml/kg), hidrato de cloral (60 ml/kg), sulfato de magnésio (127,2 ml/kg), propileno glicol (42,8 %), e etanol absoluto (11,6 %). Após a anestesia, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico para roedores, um orifício de 3 mm de diâmetro foi perfurado na convexidade direita, 2 mm posterior ao bregma e 3 mm lateral a linha média, tendo o cuidado para manter a dura-mater intacta.

Uma cânula de plástico para indução da lesão foi colocada sobre a craniotomia e fixada com cimento dental, depois de endurecido a cânula foi preenchida com salina 0,9 % e fechada com tampa apropriada, imediatamente os animais foram removidos do aparelho e alocados em suas caixas. Após 24 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano por inalação, a cânula foi conectada ao dispositivo de percussão de fluido. A lesão foi induzida por um aparelho de TCE desenvolvido em nosso laboratório, o mesmo utilizado por Silva et al., (2011).

### **3.4 Obtenção do tecido**

Após os experimentos funcionais, os animais foram novamente anestesiados com injeção intraperitoneais (i.p.), como descritos anteriormente, e, em seguida dissecados.

Para obtenção do fígado, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, uma abertura na região ventral foi realizada com uma incisão longitudinal, removendo a pele e parte das costelas do animal imediatamente após a exposição do fígado seu lóbulo primário foi dissecado. Imediatamente após a dissecação do tecido, o mesmo

foi lavado em solução salina, uma parte foi destinada para as técnicas mitocôndrias (técnica com amostras frescas), a outra imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer (-80) para posterior análise bioquímica.

## **5. ANÁLISE BIOQUÍMICA**

### **5.1. Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)**

A sonda DCFH-DA foi utilizada para a estimativa de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria. A geração de ERO mitocondrial foi determinada espectrofluorimetricamente, segundo descrito por Ali et al., (1992). A produção de EROs foi estimada no fígado de ratos com a sonda fluorescente, 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o tecido foi homogeneizado em 2,5 ml de solução salina (0,9% NaCl). Alíquotas de 2,5 ml foram incubadas na presença de DCFH-DA (5 mM) a 37 ° C durante 60 min. O DCFH-DA é hidrolisado enzimaticamente por esterases intracelulares para formar DCF não fluorescente, o qual é então oxidado para formar rapidamente altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), na presença de EROs. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs que é formado. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. A curva de calibração foi estabelecida com DCF standard (0,1 mM a 1 mM), e os níveis de EROs foram expressos em porcentagem de controle.

### **5.2. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

A determinação do  $\Delta\Psi_m$  foi estimado por alterações de fluorescência da safranina-O, ensaiadas de acordo com Akerman and Wikström (1976). Resumidamente, as amostras das mitocôndrias hepáticas (200 µg de proteína / mL) foram incubadas com o "tampão de isolamento III", safranina-O (10 µM), e os substratos das vias respiratórias, glutamato / malato (5 mM) e succinato (5 mM). A reação foi iniciada com a adição da mitocôndria centrifugadas, e o meio foi mantido

em agitação constante durante o período de ensaio. A análise de fluorescência foi realizada a 495 nm para excitação e 586 nm para emissão com larguras de fenda de 5 nm. O  $\Delta\Psi_m$  é apresentado como unidades de fluorescência arbitrárias por segundo (AFU / s).

### **5.3. Atividade da Desidrogenase mitocondrial (MTT)**

Ensaio da MTT foram realizadas com uma modificação do método descrito por Berridge e Tan (1993) (Cohen et al., 1997), exceto que o tampão de respiração foi usado como meio. Níveis de redução de MTT foram determinados como um índice da atividade das desidrogenases mitocondriais. As amostras foram incubadas em tampão contendo glutamato / succinato (5 mM cada) e de MTT (0,5 mg / ml) durante 30 min a 37° C, e a reação de redução de MTT foi parada pela adição de 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Os níveis de formazan formados foram determinados espectrofotometricamente, avaliado como a diferença na absorbância entre 570 e 630 nm e os resultados foram corrigidos pelo teor de proteína. As amostras individuais foram expressas como porcentagem do valor de controle significativo no experimento.

### **5.4 Determinação da atividade da Succinato Desidrogenase**

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de Green e Narahara (1980) modificado, utilizando o cloreto de 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio (INT) como aceptor de elétrons em um meio de incubação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), azida sódica (10 mM), solução de INT 0,8 mM, succinato de sódio 1,0 mM (pH 7,2) e ácido metilmalônico (0-10 mM) pH 7,4.

A reação foi iniciada com adição de 25  $\mu$ l da suspensão do enriquecido de mitocôndria. Após 15 minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada pela adição de 1,5 mL de álcool etílico. Os tubos foram agitados e colocados em banho de gelo por 10 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a

800 g a temperatura ambiente. A absorvância de 1mL do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 458 nm, que corresponde a redução do INT. Para a determinação da atividade da SDH, foi realizado a padronização da técnica, sendo os parâmetros concentração de enzima (proteína), concentração de substrato, tempo de ensaios e demais procedimentos utilizados, considerados ideais.

### **5.5 Grupo Carbonilas (conteúdo total de proteínas carboniladas)**

O dano oxidativo em proteínas plasmáticas foi determinado pela medida do conteúdo total de proteínas carbonilas conforme previamente descrito por Levine e colaboradores (Levine et al., 1990). Resumidamente, os homogeneizados e alíquotas de 1 ml foram misturados com 0,2 ml de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH, 10 mM) ou 0,2 ml de HCl (2 M). Após incubação, à temperatura ambiente durante 1 h em um ambiente escuro, 0,6 ml de tampão de desnaturação (tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 6,8, contendo 3% de SDS), 2 ml de heptano (99,5%), e 2 ml de etanol (99,8 %) foram adicionados sequencialmente e misturados com agitação em vórtice durante 40 segundos e centrifugada durante 15 min. Em seguida, a proteína isolada a partir da interface foi lavada duas vezes com 1 ml de acetato de etilo / etanol 1:1 (v / v) e suspenso em 1 ml de tampão de desnaturação. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 370nm, sendo a carbonilação total calculada seguindo o descrito por (LEVINE et al., 1990).

### **5.6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada em ensaio cinético colorimétrico. A atividade da enzima MnSOD em fígado de ratos foi adaptada de acordo com o método proposto por Misra e Fridovich (1972). Este método baseia-se na capacidade de MnSOD na inibição da auto-oxidação da adrenalina para adrenocromo. Em breve, a fracção do sobrenadante (100 II) foi adicionada a um tampão de bicarbonato-carbonato de meio contendo de sódio (50 mM; pH 10,2) e

adrenalina (0,4 mM). A análise cinética da MnSOD foi iniciada após a adição de adrenalina e a reação de cor foi medida a 480 nm.

### **5.7. Atividade da Enzima Catalase (CAT)**

A atividade da enzima catalase foi determinada espectrofotometricamente pela medida da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em comprimento de onda de 240 nm. O meio de reação contém solução peróxido de hidrogênio (Aebi 1984). Para o ensaio da CAT, o tecido foi homogeneizado em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 2000 g durante 10 min para obter um sobrenadante que foi utilizado para o ensaio da enzima (NELSON e KIESOW, 1972). A mistura de reação continha tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7), 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e 20 µl do sobrenadante. A taxa de reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorizada a 240 nm durante 2 min à temperatura ambiente, tal como determinado no ensaio de sangue total. A atividade enzimática foi expressa em unidades de mg<sup>-1</sup> de proteína (uma unidade de enzima é considerada a quantidade de CAT que se decompõe 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min a pH 7, a 25 ° C).

### **5.8 Atividade da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>- ATPase**

A atividade da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>- ATPase, foi medida no fígado de ratos através do protocolo adaptado de Silva et al (2013). O meio reacional constituía em 30 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, NaCl 50 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, e 50 µg de proteína na presença ou ausência de ouabaína (1 mM) para 350µL volume final. A reação foi iniciada por adição de adenosina-trifosfato (ATP) em 5 mM de concentração final. Depois de 30 min a 37 ° C, a reação foi interrompida pela adição de 70 µL de ácido tricloroacético (50%). Controles apropriados foram incluídos nos ensaios de hidrólise não enzimática de ATP. A quantidade de fosfato inorgânico libertado foi quantificada pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow e a atividade da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase foi calculada subtraindo-se a atividade de ouabaína-insensível a partir da atividade total (na ausência de ouabaína).

## **5.9. Western blotting para determinação do conteúdo de Nrf2 e de proteína Hsp 70**

Western blotting foi realizado de acordo com Franco et al., (2010), com pequenas modificações. O fígado foi homogeneizado a 4 °C em 300 mL de tampão (pH 7,0) contendo 50 mM Tris, 1 mM de EDTA, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonilo, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 20 mM, fluoreto de sódio 100 mM e cocktail de inibidores de protease (Sigma, MO). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 x g durante 10 min a 4 °C e os sobrenadantes (S1) recolhidos. Após a determinação da proteína total, o β-mercaptoetanol foi adicionado às amostras a uma concentração final de 8%. Em seguida, as amostras foram congeladas a - 80 °C para posterior análise. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para a determinação das proteínas, e a expressão da proteína β-actina. As manchas foram desenvolvidas utilizando o anticorpo secundário ligado à peroxidase e luminescência capturou numa Carestream Imagem Estação 4000mm PRO imagiologia molecular sistema.

## **5.10 Determinações das Enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) Aspartato Aminotransferase (AST)**

No soro, a atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas através dos Kits comerciais (Wiener lab.). Método U.v otimizado (IFCC). A determinação das atividades das enzimas foi mensurada em placas no leitor (Biochrom EZ Read 2000).

Foi pipetado 40 µl do reagente 1 na placa e 160 µl do Reagente 2 no mesmo poço os reagentes de trabalho foram incubados a 37 °C por 1 minuto. Um poço com água destilada (branco) foi pipetado na mesma placa, após a incubação foi adicionado 20 µl da amostra (soro ou plasma), o mesmo foi homogeneizado junto aos reagentes; as placas foram colocadas em leitor de placas em 340 nm, leitura inicial (A1) após 2 leitura (A2).

### **5.11 Análise histológica**

Para a avaliação histológica, os ratos foram submetidos à anestesia profunda (tiopental de sódio a 200 mg / kg, ip), os mesmos foram perfundidos transcardialmente com 600 mL de solução salina heparinizada (1.000 IU / ml), seguido por 600 ml de formaldeído (4%) em PBS (0, 1 H). A porção ventral do lobo lateral esquerdo do fígado foram cuidadosamente removidos e em seguida imersos em formalina durante 48 horas. As amostras de fígado foram embebidas em parafina, e, em seguida, quatro seções de cada bloco de parafina representante foram coradas com hematoxilina e eosina e fotografados digitalmente. As fatias foram analisadas por um patologista com a ajuda de um microscópio de 20 x de ampliação de acordo com a Fig 4.

### **5.12 Quantificação da proteína**

O conteúdo de proteína foi mensurado colorimetricamente pelo método de Bradford (1976). Albumina sérica bovina (1 mg/mL) será utilizada como referência padrão.

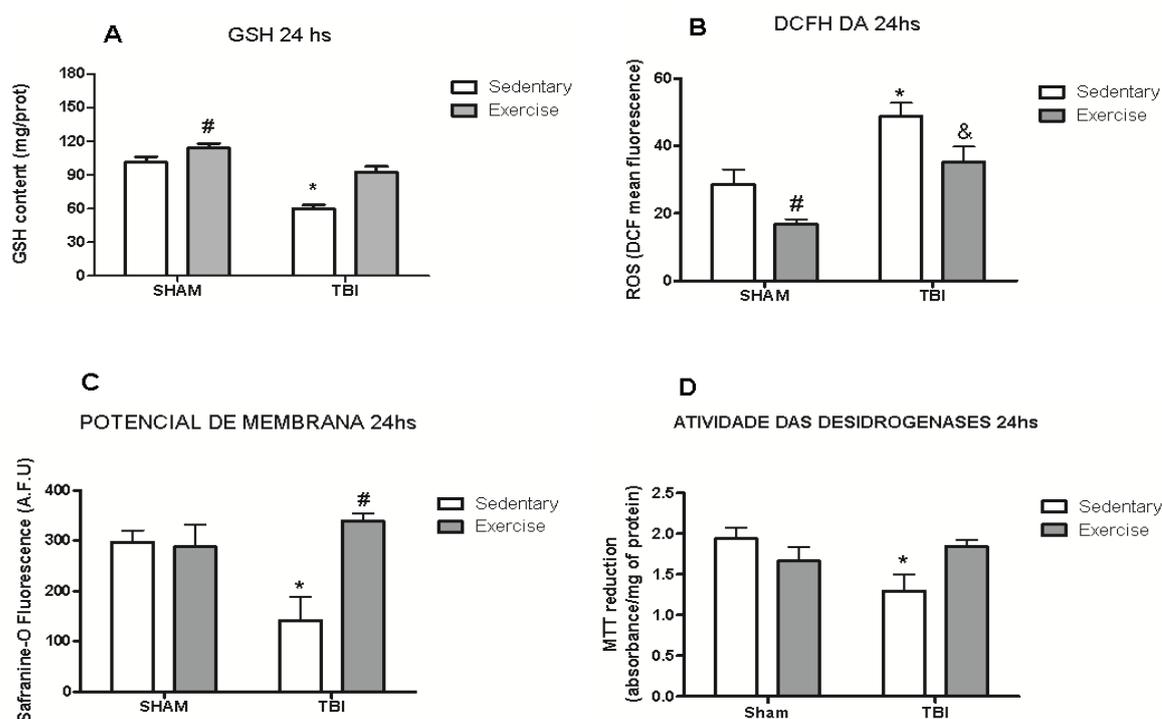
## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística utilizada foi realizada por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), quando apropriado. A análise Post Hoc foi realizada, quando apropriada, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Valores de P e F foram apresentados somente se  $P < 0,05$ .

## **7. RESULTADOS**

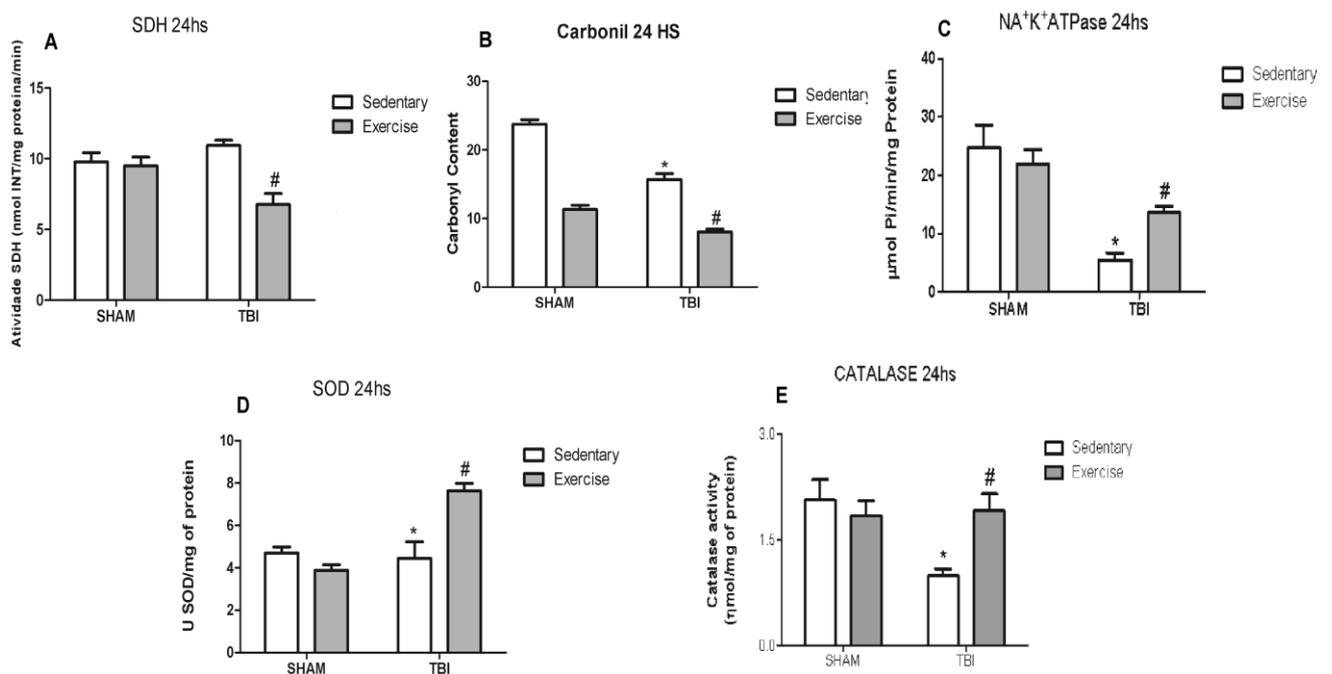
No presente estudo foi demonstrado que o exercício prévio de seis semanas de natação alterou o estado redox das células hepáticas caracterizado pelo aumento

dos níveis de GSH [ $F(1,23)= 25.46$ ;  $p<0.05$ ] e diminuição na oxidação do DCHF-DA per se [ $F(1,23)=24,04$   $p\leq 0,05$ ]. O presente protocolo de natação também protegeu contra a diminuição nos níveis de GSH [ $F(3,16)= 48.90$ ;  $p<0.05$ ] e aumento na oxidação do DCHF-DA [ $F(3,23)= 48.90$ ;  $p<0.05$ ] produzido pelo TCE 24 horas após a injuria neuronal. A análise estatística também revelou que o TCE induziu uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) nos animais sedentários e que o presente protocolo de treinamento físico protegeu contra a presente diminuição [ $F(1,19)=2,356$   $p\leq 0,05$ ]. Avaliação hepática da atividade das desidrogenases nas mitocôndrias (MTT) também revelou que TCE diminui MTT [ $F(1,21)=2,085$   $p\leq 0,05$ ] e que o exercício físico prévio protegeu contra a presente diminuição.



**Figura 1.** (A) Efeitos do exercício prévio de seis semanas sobre o conteúdo de GSH, comparando animais sedentários e exercício. (B) Efeitos do exercício prévio sobre a oxidação de DCF em amostras de mitocôndrias hepáticas de ratos treinados e sedentários. (C) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas amostras de fígado. (D) Avaliação da atividade das desidrogenases em mitocôndria hepáticas. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ) e foram analisados por ANOVA, Seguido pelo teste de Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  do controle. Diferenças significativas são marcadas com \*.

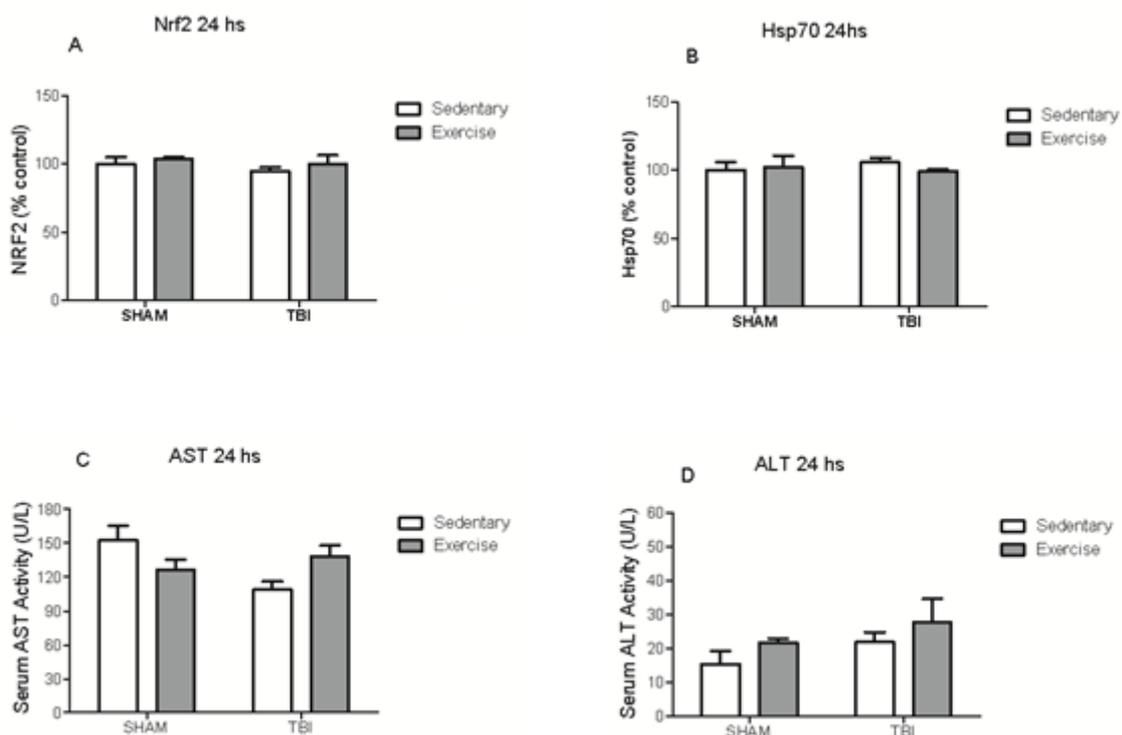
Surpreendentemente, nossos dados experimentais revelaram que o TCE diminui a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em animais treinados [F(1,24)=1,464 p≤0,05] quando comparado com animais controles sedentários. O presente modelo experimental de TCE também induziu um aumento no conteúdo de proteína carbonil e diminuição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase nos animais sedentários [F(1,19)=37,57 p≤0,05]. Dano este que foi atenuado pelo protocolo prévio de treinamento físico de natação. Já a análise bioquímica da atividade das enzimas antioxidantes revelaram que o presente protocolo de treinamento atenuou o aumento da atividade da enzima SOD e protegeu da inibição da enzima catalase [F(1,28)=5,053 ≤0,05] induzidas pelo TCE.



**Figura 2.** (A) Atividade da SDH nas amostras hepáticas de animais treinados e sedentários submetidos ao TCE. (B) Avaliação da atividade da NA + k + ATP ase em amostras de fígado de ratos. (C) Atividade da superóxido dismutase em amostras de fígado. (D) Atividade da catalase. Os dados são expressos como média ± S.E.M. (n = 5) e foram analisados por ANOVA, Seguido pelo teste de Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças foram consideradas quando p ≤ 0,05 do controle. Diferenças significativas são marcadas com \*.

Estudos recentes têm evidenciado que fatores de transcrição sensível a alterações redox exercem efeitos regulatórios em mecanismos de sobrevivência da célula (HONG et al., 2010). Neste sentido, decidimos investigar se o efeito profilático exercido pelo treinamento físico de natação neste modelo experimental de TCE envolve a participação de fatores como Nrf2 e HSP70. A análise estatística revelou que o exercício físico bem como o TCE não alterou a expressão de Hsp70 e Nrf2.

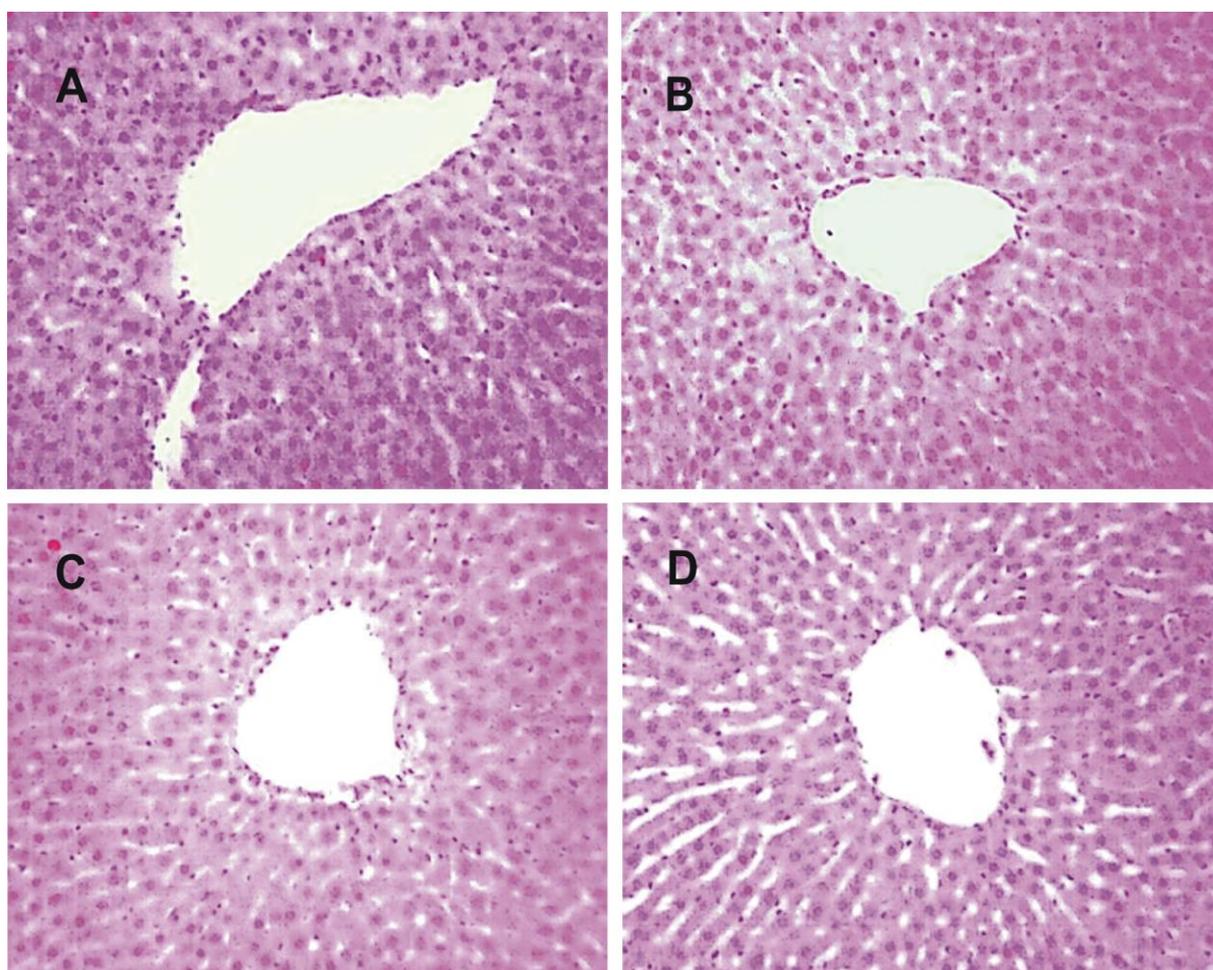
Da mesma forma, não foi observado no presente estudo alteração nos níveis séricos de Aspartato-aminotransferase (AST) e [F(1,8)=2,598 p≤0,05], Alanina-aminotransferase (ALT) [F(1,8)=2,215 p≤0,05] bem como lesão hepática quando analisado 24 horas após a injúria neuronal. Estes dados sugerem que alterações oxidativas geradas pelo TCE no fígado não afeta a viabilidade celular hepática quando analisado 24 hrs após o TCE.



**Figura 3.** (A) Demonstrativo da expressão gênica de NRF2 avaliado em fígado de ratos. (B) Expressão genica de HSP70em fígado de ratos. (C) Níveis de Aspartato aminotransferase (AST). (D) Alanina aminotransferase no soro de animais treinados e sedentários submetidos ao TCE. Os dados são expressos como média ± S.E.M. (n = 5) e foram analisados por ANOVA, Seguido pelo teste de

Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  do controle. Diferenças significativas são marcadas com \*.

**Figura 4. Demonstrativo de dano celular dos diferentes grupos experimentais.**



**Figura 4.** Secções de fígado de ratos no grupo sedentário / Sham (A), Exercício / Sham (B), Sedentários / TBI (C), e Exercício / TBI (D) mostrou histologia hepática normal com hepatócitos

localizados em placas irregulares planas dispostas radialmente em torno da veia central. A esteatose hepática é ausente nos grupos tratados. (H & E 20X).

## 8. DISCUSSÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é o principal determinante de incapacidade e mortalidade em pessoas entre 1 a 44 anos (BRUNS E HAUSER, 2003). Indivíduos que sofrem o TCE podem apresentar alterações físicas, transtornos motores e sensoriais bem como alterações neuropsicológicas como transtornos cognitivos de comportamento e emocionais (SALMOND E SAHAKIAN, 2005). Devido a grande variedade de condições associadas ao TCE, há considerável interesse no desenvolvimento e posterior aplicação de marcadores bioquímicos que se relacionem não somente com a gravidade do dano cerebral, mas também, com o desenvolvimento de problemas em outros tecidos no organismo. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo, no primeiro momento, investigar se o TCE altera: o estado redox das células hepáticas, a função mitocondrial e atividade de enzimas alvo de radicais livres 24 horas após o TCE. Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho revelaram que animais que sofreram o TCE apresentaram uma alteração no estado redox das células hepáticas caracterizado pelo aumento na oxidação do DCHF-DA e redução nos níveis de GSH. O TCE também induziu uma diminuição no potencial de membrana, bem como na atividade das desidrogenases mitocondriais (MTT). A alteração no metabolismo hepático causada pelo TCE foi seguida pela diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Apesar das alterações oxidativas geradas pelo TCE no fígado não afetarem a viabilidade celular hepática, nossos dados experimentais traduz um novo fenótipo hepático que é mais suscetível às consequências deletérias associadas ao TCE.

Apesar de estar bem descrito na literatura que o TCE tem como consequências a produção excessiva de radicais livres (GRIESBACH et al., 2008), ainda existem várias lacunas no entendimento do processo de desenvolvimento

deste dano secundário. Além disso, não existem tratamentos capazes de prevenir, ou mesmo para tratar estas consequências (MAAS, 2001; NARAYAN et al., 2002; TOLIAS & BULLOCK, 2004), pois os mecanismos que delineiam o aparecimento destes problemas ainda precisam ser definidos. Neste contexto, estudos têm reportado que o exercício físico, por elevar o consumo de oxigênio e a atividade mitocondrial, é capaz de gerar altas concentrações de EROs e, conseqüentemente, estresse oxidativo em diversos órgãos e tecidos, dentre os quais destaca-se o fígado (SILVA et al., 2011; SERVAIS et al., 2003; OGONOVSKY et al., 2005). Por outro lado, sabe-se que o exercício físico crônico é capaz de gerar adaptações fisiológicas que influenciam no preparo do organismo para um novo estresse e também protege contra lesões produzidas pelas EROs (JI et al., 1992; CLARKSON PM, TREMBLAY., 1988). No presente estudo foi demonstrado que o exercício prévio de seis semanas de natação foi capaz de alterar o estado redox das células hepáticas, sendo aqui caracterizado pelo aumento dos níveis de GSH e diminuição na oxidação do DCHF *per se*. Estes resultados corroboram estudos desenvolvidos por Franco (2007) que revelaram um aumento nas defesas antioxidantes hepáticas (GSH) em ratos submetidos a dieta hiperlipídica. Estudos em humanos também evidenciaram níveis aumentados de glutathiona total (GSH e GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) em corredores brandamente treinados (17-43 km semanais) (ROBERSTSON et al. 1991), bem como, em corredores altamente treinados (80-147 km semanais) (ORTENBLAD et al., 1997). Esses dados sugerem que o exercício físico de longa duração aumenta a atividade das enzimas antioxidantes a fim de combater o maior nível de estresse causado pela exposição contínua ao exercício físico. Sabe-se também que o exercício físico influencia no equilíbrio da glutathiona de uma forma sistêmica, uma vez que aumenta a liberação de GSH para o plasma assim como a captação do mesmo por tecidos extra-hepáticos, garantindo um suprimento adequado deste composto nos tecidos (LEEJWENBURGH e JI, 1996; JI et al., 1998). Assim, considerando que o TCE é capaz de diminuir os níveis de GSH e aumentar a oxidação do DCFH (HUNOT e FLAVELL, 2001; ICHIDA e FINKEL, 2001), é plausível propor que o exercício físico pode modular moléculas importantes para promover o reparo funcional após TCE experimental (GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2007).

Cabe salientar que a disfunção mitocondrial após o TCE tem sido associada à diminuição na transferência de elétrons nos complexos da cadeia respiratória, diminuição na produção de energia (XIONG et al., 1997), aumento da produção de EROs, danos oxidativos, perturbações da homeostase (AZBILL et al., 1997; MATSUSHITA e XIONG, 1997; SULLIVAN, THOMPSON e SCHEFF, 1999) e morte celular por apoptose ou necrose (ROBERTSON, 2004). Diante do exposto acima, utilizamos mitocôndrias isoladas para testar a hipótese de que o TCE poderia induzir consequências deletérias também nas mitocôndrias hepáticas. Nossos resultados mostraram pela primeira vez que o TCE induz alteração no potencial de membrana mitocondrial. Nosso estudo também demonstrou que o exercício físico protegeu dessa redução, indicando que atividade física é eficaz na manutenção da homeostasia mitocondrial hepática que parece ser perdida com o TCE.

Além disso, em uma avaliação de nossos achados podemos dizer que o TCE induziu um aumento de EROs ao mesmo tempo em que causou uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial nos ratos sedentários. Um possível responsável pela associação entre a formação de EROs e a alteração do  $\Delta\Psi_m$  é o aumento no influxo de  $Ca^{2+}$ . Isso porque, uma alteração no equilíbrio de prótons através da membrana mitocondrial interna pode causar uma modificação no  $\Delta\Psi_m$ , o que pode diminuir a atividade dos complexos mitocondriais e, assim, o estado redox da mitocôndria por aumentar, facilita o escape de elétrons nos complexos da cadeia respiratória (STARKOV and FISKUM, 2003). Nesta linha, porém utilizando exercício exaustivo, Lima et al (2013) relatou que o treinamento de natação induz adaptações positivas em mitocôndrias do fígado de ratos, caracterizadas por aumentos na GSH / GSSG, atividade SODMn, redução do MTT e  $\Delta\Psi_m$ , redução dos níveis de TBARS e carbonilação proteica, referindo que o treinamento de natação induziu aumento das defesas antioxidantes capazes de lidar bem com as EROs geradas pelo exercício, bem como, preservou o estado redox mitocondrial hepático após o protocolo de teste exaustivo.

Nossos dados experimentais revelaram que o TCE diminui a atividade da enzima (SDH) no fígado de animais treinados, embora não tenha sido visto uma diminuição nos animais exercício sham. A ausência de efeitos do exercício sobre o complexo II da cadeia respiratória não é inédita na literatura. Navarro e

colaboradores (2004) mostraram que a atividade/expressão dos complexos II e III não é alterada pelo exercício crônico (24 semanas) em cérebro, fígado e coração de ratos.

Nesta linha de raciocínio nossos dados revelaram que o TCE induziu um aumento na atividade da enzima SOD e uma diminuição na atividade da catalase em animais sedentários. Moinard e colaboradores (2008) mostraram que ocorre um aumento do número de neutrófilos no fígado de ratos que sofreram TCE. Sabe-se que os neutrófilos são capazes de gerar radicais livres através da atividade das enzimas Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH-oxidase) e da mieloperoxidase (MPO) num processo conhecido como explosão respiratória (RADA et al., 2004). Nesse processo o superóxido é produzido pela NADPH oxidase e convertido em peróxido de hidrogênio pela SOD e finalmente o peróxido de hidrogênio é convertido em ácido hipocloroso pela MPO (BURG e PILLINGER, 2001). Neste sentido, um aumento da atividade da enzima SOD seguido pela inibição da enzima catalase no grupo sedentário permitiu-nos supor que os níveis elevados de peróxido de hidrogênio formado pela ação da SOD persistem devido à atividade inadequada de catalase. A atividade da catalase é normalmente inibida por um excesso de  $H_2O_2$ , bem como por HNE-4, o qual forma aduetos de aldeído-proteínas com a enzima de inativação em seu centro ativo (KOSTYUKL, et al, 2010; LUBRANO et al, 2015.). Nestas circunstâncias, o excesso de peróxido de hidrogênio pode ser desviado como substrato para a MPO que também é uma geradora de espécies reativas. Assim, nossos achados referentes à alteração da atividade das enzimas antioxidantes e ao aumento de espécies reativas são condizentes com o aumento do número de neutrófilos encontrado por Moinard et al (2002).

A bomba  $Na^+K^+ATPase$  presente no tecido hepático tem papel importante em uma infinidade de sistemas de transporte de membrana, está envolvida na regulação da homeostasia intracelular de íons, do potencial de membrana, do pH intracelular e do próprio transporte iônico, os quais são dependentes de um gradiente de  $Na^+$  e, por isso, são dependentes da  $Na^+,K^+ATPase$ , Assim essa enzima é essencial também no tecido hepático (LANDMANN et al. 1998). Nós mostramos pela primeira vez que o TCE é capaz de inibir a enzima  $Na^+,K^+ATPase$  no fígado. Levando em conta nossos achados sobre produção de espécies reativas

pós-trauma cerebral, era de se esperar que a atividade dessa bomba estivesse diminuída nos animais que sofreram lesão. Isso porque a enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase parece ser particularmente sensível aos danos induzidos por agentes oxidantes sobre a composição da membrana plasmática (SIEMS et al., 1996; DENCHER et al., 2007; PARI E MURUGAVEL, 2007).

Nós também demonstramos que está inibição da enzima pôde ser prevenida pelo protocolo de natação utilizado neste trabalho. Esses achados corroboram com estudos prévios nos quais se demonstrou que o mesmo protocolo de natação é capaz de impedir a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase e estresse oxidativo induzidos por pentilenotetrazol (agente convulsivante antagonista do receptor GABA-A) no cérebro de ratos e em modelo de traumatismo craniano experimental (SOUZA et al., 2009; LIMA et al., 2009).

Apesar da necessidade de maiores investigações, alguns autores apontam que o exercício físico predominantemente aeróbico, praticado regularmente e com uma intensidade moderada pode promover uma melhor resposta das defesas antioxidantes do organismo (ELOSUA et al., 2003). Além disso, as EROs por ele produzidas também podem modular a expressão de enzimas relacionadas à proteção celular como o fator de transcrição Nrf2 (fator relacionado à NF-E2) e as proteínas de choque térmico (HSPs). O Nrf2 é fator de transcrição sensível a alterações redox que tem sido relatado como sendo um regulador pleiotrópico dos mecanismos de sobrevivência da célula (OWUOR; KONG, 2002). Estudos recentes demonstraram que o Nrf2 tem um papel indispensável na indução de enzimas antioxidantes (HONG et al., 2010). Em condições de estresse oxidativo, Nrf2 transloca-se para o núcleo, ativando a transcrição de importantes enzimas envolvidas na defesa antioxidante, como: enzimas envolvidas no ciclo catalítico da GSH, SOD, Heme oxigenase, além de facilitar a produção de NADPH. Ainda pode aumentar a proteção celular pela expressão de heat shock proteins e subunidades do proteossoma (LEONARDO; DORE, 2011; JAIN; BLOOM; JAISWAL, 2005; OSBURN et al., 2006). As HSPs são classificadas em famílias de acordo com o peso molecular, as HSP70 têm alta expressão em mamíferos e pode se apresentar na isoforma HSP73 na célula em situação basal ou HSP72 em condições de

estresse, auxiliando na restauração da estrutura e função celular (HECK., 2008; FEDER and HOFMANN., 1999).

Diante do exposto acima, decidimos investigar se o efeito profilático exercido pelo treinamento físico de natação neste modelo experimental de TCE envolve a participação de fatores como Nrf2 e HSP70. A análise estatística revelou que o exercício físico bem como o TCE não alterou a expressão de Hsp70 e Nrf2. Tal fato pode estar associado ao modelo de trauma utilizado não ter levado a ativação suficiente destes fatores ou pela avaliação ter sido realizada a nível hepático, sendo que a maioria dos trabalhos avalia a expressão dessas proteínas em nível intramuscular, ou ainda, pelo momento em que a avaliação ocorreu. Neste sentido, estudos tem evidenciado que estresse oxidativo proveniente do TCE aumenta a expressão de Nrf2, porém, esse aumento não é suficiente para evitar o dano oxidativo (HONG et al., 2010). Como discutido anteriormente, a ativação de Nrf2 pode aumentar a expressão de diversas enzimas antioxidantes, além de diminuir a inflamação, protegendo células contra danos oxidativos em diversas situações e patologias, instigando futuros estudos para, quem sabe, descobrir uma via ou fator para esta ativação, incrementando os níveis de Nrf2 e a proteção antioxidante. Sabe-se que o treinamento de oito semanas promove um aumento significativo na expressão de HSP72 em diversos tecidos (ATALAY et al., 2004). Porém, não há relatos sobre esta configuração de treinamento em relação ao HSP70, o qual foi avaliado em nosso estudo e não apresentou resultado significativo.

A avaliação da atividade sérica das enzimas aminotransferases (AST e ALT) são indicadores sensíveis de lesão celular hepática e constituem ferramentas úteis no reconhecimento de doenças hepatocelulares agudas como é o caso da hepatite, (CAVALLI et al.,1978). Por este motivo analisamos as concentrações destas enzimas no soro de animais treinados e sedentários submetidos ao traumatismo cranioencefálico, com a finalidade de investigar tais efeitos no fígado. As aminotransferases estão normalmente presentes no soro em baixas concentrações e são liberadas no fígado em maiores quantidades quando há lesão da membrana celular do hepatócito, resultando em permeabilidade aumentada (PIÑEIRO – CARRERO; PIÑEIRO, 2004; PROVAN; KRENTZ, 2002).

De acordo com nosso estudo, o TCE e nem o exercício de seis semanas induziram lesão hepática quando analisado 24 horas após a injúria neuronal. Estes resultados concordam com os dados da análise histológica, na qual também não foram evidenciadas lesões em nenhum dos grupos analisados. Assim podemos sugerir que as alterações oxidativas geradas pelo TCE no fígado não foram capazes de induzir danos hepatocelulares, pelo menos no tempo em que foram avaliadas neste trabalho.

## **9. CONCLUSÃO**

Mediante os resultados apresentados, os dados experimentais nos permitem concluir que o protocolo de natação utilizado em nosso trabalho apresenta efeitos protetores sobre a função mitocondrial e conseqüentemente na produção de EROS induzidas pelo TCE. É possível ainda sugerir que esses efeitos do exercício podem dever-se a sua capacidade de melhorar as defesas antioxidantes (GSH, SOD, CAT) ou ao seu conhecido efeito sobre a biogênese mitocondrial. Portanto, o exercício físico de forma profilática pode exercer papel importante contra o comprometimento hepático causado pelo TCE, embora novos estudos sejam necessários a fim de identificar as vias e mecanismos pelas quais o TCE pode afetar o fígado.

## 10. REFERÊNCIAS

- ADAMOPOULOS S., PARISSIS J.T., KREMASTINOS D.T. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. **Eur J Heart Fail.** 2001, 3(5):517-26.
- AMES, D.; CHIU, E. Drugs used for psychiatric disorders. **Med J Aust**, v. 159, n. 2, p. 116-120, Jul 19 1993.
- ANNEGERS, J. F. et al. Seizures after head trauma: a population study. **Neurology**, v. 30, n. 7 Pt 1, p. 683-689, Jul 1980.
- ANTHONY, D. C.; COUCH, Y. The systemic response to CNS injury. **Exp Neurol**, v. 258, p. 105-111, Aug 2014.
- AOI, W. et al. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. **Life Sci**, v. 75, n. 26, p. 3117-3128, Nov 12 2004.
- AKIMOTO, T. et al. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. **J Biol Chem**, v. 280, n. 20, p. 19587-19593, May 20 2005.
- ATALAY M, OKSALA NK, LAAKSONEN DE, KHANNA S, NAKAO C, LAPPALAINEN J, et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **J Appl Physiol.** 2004; 97 (2): 605-11.
- ATKINSON, P. R. et al. Abdominal and Cardiac Evaluation with Sonography in Shock (ACES): an approach by emergency physicians for the use of ultrasound in patients with undifferentiated hypotension. **Emerg Med J**, v. 26, n. 2, p. 87-91, Feb 2009.
- AZBILL, R. D. et al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. **Brain Res**, v. 765, n. 2, p. 283-290, Aug 15 1997.
- BANERJEE S, MURRAY J, FOLEY B, et al. 2003. Predictors of institutionalisation in older people with dementia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 74: 1315–1516.
- BAKER, A. J. et al. Effects of resuscitation fluid on neurologic physiology after cerebral trauma and hemorrhage. **J Trauma**, v. 64, n. 2, p. 348-357, Feb 2008.
- BEGRICHE, K. et al. Genetic dissection of the functions of the melanocortin-3 receptor, a seven-transmembrane G-protein-coupled receptor, suggests roles for central and peripheral receptors in energy homeostasis. **J Biol Chem**, v. 286, n. 47, p. 40771-40781, Nov 25 2011.
- BELCASTRO, A. N. et al. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 80, n. 4, p. 1331-1335, Apr 1996.
- BENARD, G. et al. Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 8, p. 1543-1554, 2008.
- BENARD, G.; ROSSIGNOL, R. Mitochondrial fluidity matters. Focus on "Inherited complex I deficiency is associated with faster protein diffusion in the matrix of moving mitochondria". **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, n. 5, p. C1123, May 2008.
- BERG A, HALLE M, FRANZ I, et al. Physical activity and lipoprotein metabolism: epidemiological evidence and clinical trials. **Eur J Med Res** 1997;2:259-64.

- BLAIR S.N., CHENG Y., HOLDER J.S. (2001) Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? **Medicine and Science in Sports and Exercise** 33(6), 379-399.
- BLOOMER, R. J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Adv Clin Chem**, v. 46, p. 1-50, 2008.
- BLUMBERGS, P. C. et al. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 4, p. 565-572, Aug 1995.
- BOOTH, F.W.; CHAKRAVARTHY, M.V.; SPANGENBURG, E.E. Exercise and gene expression.: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J Psysiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 399-411, 2002.
- BOVERIS, A., AND NAVARRO, A. (2008). Brain mitochondrial dysfunction in aging. **IUBMB Life** 60, 308–314.
- BUBICI, C. et al. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 1, p. 69-80, Jan 2006.
- BRUNS, J., JR.; HAUSER, W. A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 10, p. 2-10, 2003.
- CABRERA, M. et al. The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 10, p. 4114-4125, Oct 2003.
- CARMELI, E. et al. Muscle strength and mass of lower extremities in relation to functional abilities in elderly adults. **Gerontology**, v. 46, n. 5, p. 249-257, Sep-Oct 2000.
- CARNEIRO, A. V. Coronary heart disease in diabetes mellitus: risk factors and epidemiology. **Rev Port Cardiol**, v. 23, n. 10, p. 1359-1366, Oct 2004.
- CAVALLI, F.; TSCHOPP, L.; SONNTAG, R.W; ZIMMERMANN, A. A case of liver toxicity following cis-dichlorodiammineplatinum (II) treatment. **Cancer Treat Rep.**, Bethesda, v. 12,p.2125-2126, 1978.
- CERUTTI, H.; IBRAHIM, H. Z.; JAGENDORF, A. T. Treatment of pea (*Pisum sativum* L.) protoplasts with DNA-damaging agents induces a 39-kilodalton chloroplast protein immunologically related to *Escherichia coli* RecA. **Plant Physiol**, v. 102, n. 1, p. 155-163, May 1993.
- CHAPADOS, N. A. et al. Effects of exercise training on hepatic microsomal triglyceride transfer protein content in rats. **Horm Metab Res**, v. 41, n. 4, p. 287-293, Apr 2009.
- CHARRUEAU, C. et al. Metabolic response and nutritional support in traumatic brain injury: evidence for resistance to renutrition. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 11, p. 1911-1920, Nov 2009.
- CHO, Y. G. et al. The estimation of cardiovascular risk factors by body mass index and body fat percentage in Korean male adults. **Metabolism**, v. 58, n. 6, p. 765-771, Jun 2009.
- CLARKSON, P. M.; TREMBLAY, I. Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. **J Appl Physiol (1985)**, v. 65, n. 1, p. 1-6, Jul 1988.
- COLOMBO, F. et al. [Liver trauma: experience in the management of 252 cases]. **Chir Ital**, v. 57, n. 6, p. 695-702, Nov-Dec 2005.
- COLOMBO, M. et al. Prevention of hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats by exercise training: effects on gene expression in insulin-sensitive tissues determined by high-density oligonucleotide microarray analysis. **Metabolism**, v. 54, n. 12, p. 1571-1581, Dec 2005.

COSTA, M. G. Ginástica localizada. 2ª Ed., Rio de Janeiro. Ed. **Sprint**, 1998. SILVA, N.P. Atletismo. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Cia Brasil, 1998.

CORONADO, V. G. et al. Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995-2009. **J Safety Res**, v. 43, n. 4, p. 299-307, Sep 2012.

CORONADO, X. et al. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmission cycle: the evaluation in the sylvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 4, p. 656-659, Oct 2009.

CORSO, P. et al. Incidence and lifetime costs of injuries in the United States. **Inj Prev**, v. 12, n. 4, p. 212-218, Aug 2006.

COSTA, A. N. C. G. D. et al. **Afetividade e sexualidade na educação : um novo olhar**. Belo Horizonte, Brazil/Salvador, Brazil: Secretaria de Estado da Educação de Minas Gerais ;Fundação Odebrecht, 1998. 251 p.

DAMOND, F. et al. Quality control assessment of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) viral load quantification assays: results from an international collaboration on HIV-2 infection in 2006. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 6, p. 2088-2091, Jun 2008.

DENCHER, N. A. et al. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. **Ann N Y Acad Sci [S.I.]**, v. 1100, p. 291-8, Apr 2007.

DOS SANTOS, J. W. et al. An unusual presentation of paracoccidioidomycosis in an AIDS patient: a case report. **Mycopathologia**, v. 142, n. 3, p. 139-142, 1998.

ELOSUA, R., MOLINA, L., FITO, M., ARQUER, A., SANCHEZ-QUESADA, J. L., COVAS, M. I., et al. (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. **Atherosclerosis**, 167(2), 327-334.

FAULKNER, G.; PETTIT, S. H. Post-traumatic appendicular-cutaneous fistula: a case report. **Ann R Coll Surg Engl**, v. 92, n. 1, p. W6-7, Jan 2010.

FEDER M.E., HOFMANN G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu Ver Physiol**. 1999;61:243-82.

FIEBIG, R. G. et al. Training down-regulates fatty acid synthase and body fat in obese Zucker rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 7, p. 1106-1114, Jul 2002.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, Nov 9 2000.

FINKEL E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? **Science**. 2001;292:624–626.

FLINT, J. et al. Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globin cluster. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 4, p. 371-382, Feb 15 2001.

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

FUKAGAWA, N. K. Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222, n. 3, p. 293-298, Dec 1999.

GENNARELLI, T. A. The spectrum of traumatic axonal injury. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 22, n. 6, p. 509-513, Dec 1996.

GLEESON M.(2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* 103, 693–699.

GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VINA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 126-131, Jan 15 2008.

GRAHAM, D. I. et al. The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. **Brain Pathol**, v. 5, n. 4, p. 397-406, Oct 1995.

GRAHAM, G. F. et al. Patients with solar keratosis, particularly of the trunk or lower extremities, are at high risk for skin cancer development. **Clin Exp Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 717-718, Nov 2005.

GRIESBACH, G. S. et al. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 530-540, Jun 23 2008.

GRIESBACH G.S. GOMEZ-PINILLA F., HOVDA D.A. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. **J Neurotrauma**. 2007;24:1161–117.

GUALANO AB, BOZZA T, LOPES DE CAMPOS P, ROSCHEL H, DOS SANTOS COSTA A, LUIZ MARQUEZI M, BENATTI F, HERBERT LANCH A JUNIOR A. Branched-chain amino acids supplementation enhances exercise capacity and lipid oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion. **J Sports Med Phys Fitness**. Mar;51(1):82-8. 2011.

GUTTERIDGE, J. M. Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents? **Redox Rep**, v. 4, n. 3, p. 129-131, 1999.

HACKL, J. M. et al. Endocrine abnormalities in severe traumatic brain injury--a cue to prognosis in severe craniocerebral trauma? **Intensive Care Med**, v. 17, n. 1, p. 25-29, 1991.

HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Nutr Rev**, v. 57, n. 4, p. 104-113, Apr 1999.

HELLSTEN, Y. et al. Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. **Acta Physiol Scand**, v. 157, n. 2, p. 191-197, Jun 1996.

HECK A.J. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. **Nat. Methods**.2008;5:927–933.

HIGGS, S.; BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N. The effect of cytotoxic lesions of the hippocampus on recognition memory in the rat: effects of stimulus size. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 6, p. 1193-1203, Dec 2001.

HIGUCHI M, CARTIER LJ, CHEN M, HOLLOSZY JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. **J Gerontol**. 1985;40:281–286.

HOENE, M. et al. Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 1, p. 241-252, Jan 15 2009.

HONG YB, KANG HJ, KWON SY, KIM HJ, KWON KY, CHO CH, LEE JM, KALLAKURY BV, BAE I. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 regulates drug resistance in pancreatic cancer cells. **Pancreas**. 2010;39:463–472.

HUNG, G. U. et al. Worsening of left ventricular ejection fraction induced by dipyridamole on TI-201 gated myocardial perfusion imaging predicts significant coronary artery disease. **J Nucl Cardiol**, v. 13, n. 2, p. 225-232, Mar-Apr 2006.

HUNOT, S.; FLAVELL, R. A. Apoptosis. Death of a monopoly? **Science**, v. 292, n. 5518, p. 865-866, May 4 2001.

ICHIDA, M.; FINKEL, T. Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 5, p. 3524-3530, Feb 2 2001.

JAIN, A. K.; BLOOM, D. A.; JAISWAL, A. K. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 32, p. 29158–29168, 12 ago. 2005.

JANNETTA, P. J. Letter: Tic douloureux and facial spasm. **JAMA**, v. 228, n. 13, p. 1637-1638, Jun 24 1974.

JI, Y. Y. et al. [Study on anti-atherosclerotic mechanisms of divided functional recipes of dahuang zhechong pill in rabbits]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 32, n. 11, p. 1077-1081, Jun 2007.

JI, L. L.; FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J Appl Physiol (1985)**, v. 72, n. 2, p. 549-554, Feb 1992.

JI LL, FU R, MITCHELL EW. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1854-1858, 1992.

JI, P., et al. (1998) The cytoplasmic Cu,Zn superoxide dismutase of *saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. **J Biol Chem** 273(36):22921-8.

JUNQUEIRA, V. B. et al. Aging and oxidative stress. **Mol Aspects Med**, v. 25, n. 1-2, p. 5-16, Feb-A  
KANG, J. et al. Regulating intensity using perceived exertion: effect of exercise duration. **Eur J Appl Physiol**, v. 105, n. 3, p. 445-451, Feb 2009.

KASPRZAK, K. S. et al. Intracellular distribution of the antimutagenic enzyme MTH1 in the liver, kidney and testis of F344 rats and its modulation by cadmium. **Exp Toxicol Pathol**, v. 53, n. 5, p. 325-335, Oct 2001.

KHAN, K. et al. Preventing cervical cancer : overviews of the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program and 2 US immunization programs. **Cancer**, v. 113, n. 10 Suppl, p. 3004-3012, Nov 15 2008.

KLUGHERZ, B. D. et al. Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. **Coron Artery Dis**, v. 13, n. 3, p. 183-188, May 2002.

KOZARSKY, K. et al. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 2, n. 2, p. 163-169, 1989.

KRIEGER, J. B.; LI, Y. Accurate orbital-independent density-functional potential including self-interaction correction. **Phys Rev A**, v. 39, n. 11, p. 6052-6055, Jun 1 1989.

KURATA, M. et al. Preoperative detection and handling of aberrant right posterior sectoral hepatic duct during laparoscopic cholecystectomy. **J Hepatobiliary Pancreat Sci**, v. 22, n. 7, p. 558-562, Jul 2015.pr 2004.

LANDMANN et al. Expression, Distribution, and Activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase in Normal and Cholestatic Rat Liver. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. Volume 46(3): 405–410, 1998.

LEE, P. H. et al. Stage of exercise and health-related quality of life among overweight and obese adults. **J Adv Nurs**, v. 53, n. 3, p. 295-303, Feb 2006.

LEEUWENBURGH, C. and JI, L. L. 1996. alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. **J. Nutr.** 126: 1833-1843.

LEEUWENBURGH C, HOLLANDER J, LEICHTWEIS S, GRIFFITHS M, GORE M, JI LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 1997;272:R363–R369.

LEONARDO, C. C.; DORE, S. Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 226–236, set. 2011.

LIMA, F. D. et al. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55668, 2013.

LIMA et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. **Behavioural Brain Research**, 193(2008), 306-310.

LIU, W. et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 4), p. 635-641, Feb 2000.

MAAS, A. I. Neuroprotective agents in traumatic brain injury. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 10, n. 4, p. 753-767, Apr 2001.

MAAS, A. I.; STOCCHETTI, N.; BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 8, p. 728-741, Aug 2008.

MAAS, H.; SANDERCOCK, T. G. Force transmission between synergistic skeletal muscles through connective tissue linkages. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 575672, 2010.

MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2003.

MANSOOR, O. et al. Effect of an enteral diet supplemented with a specific blend of amino acid on plasma and muscle protein synthesis in ICU patients. **Clin Nutr**, v. 26, n. 1, p. 30-40, Feb 2007.

MATSUSHITA, M.; XIONG, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. **J Comp Neurol**, v. 377, n. 2, p. 251-261, Jan 13 1997.

MAXWELL, W. L. et al. Post-acute alterations in the axonal cytoskeleton after traumatic axonal injury. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 2, p. 151-168, Feb 2003.

MAZZEO, A. T. et al. Quantitation of ischemic events after severe traumatic brain injury in humans: a simple scoring system. **J Neurosurg Anesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 170-178, Jul 2006.

MEFFORD, H. C. et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. **N Engl J Med**, v. 359, n. 16, p. 1685-1699, Oct 16 2008.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 2, p. 286-300, Nov 2007.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 17, n. 3, p. 235-248, Sep 1994.

MIRZAYAN, M. J. et al. Systemic effects of isolated brain injury: an experimental animal study. **Neurol Res**, v. 30, n. 5, p. 457-460, Jun 2008.

- MOINARD, C.; CALDEFIE-CHEZET, F.; WALRAND, S.; VASSON, M.P.; CYNOBER, L. Evidence that glutamine modulates respiratory burst in stressed rat polymorphonuclear cells through its metabolism into arginine. **Br J Nutr.**88(6):689-695,2002.
- MOINARD, C. et al. Evidence for impairment of hepatic energy homeostasis in head-injured rat. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 2, p. 124-129, Feb 2008.
- MOINARD, C. et al. Characterization of the alteration of nutritional state in brain injury induced by fluid percussion in rats. **Intensive Care Med**, v. 31, n. 2, p. 281-288, Feb 2005.
- MONCADA, C.; ISRAEL, Y. Protein binding of alpha-hydroxyethyl free radicals. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 12, p. 1723-1728, Dec 2001.
- MUTHUSAMY, V. R. et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 2, p. 366-376, Jan 15 2012
- NAVARRO, A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. **Molecular Aspects of Medicine** 25:37-4; 2004.
- NAVARRO, M. A. et al. Response of ApoA-IV in pigs to long-term increased dietary oil intake and to the degree of unsaturation of the fatty acids. **Br J Nutr**, v. 92, n. 5, p. 763-769, Nov 2004.
- NARAYANAN, U. et al. Exogenous endothelin-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia in the rat. **Regul Pept**, v. 105, n. 1, p. 1-7, Apr 15 2002.
- NIEMAN DC.(2003) Current perspective on exercise immunology. **Current Sports Medicine Reports** 2, 239-242.
- NIESS, A. M. et al. Effects of RRR-alpha-tocopherol on leukocyte expression of HSP72 in response to exhaustive treadmill exercise. **Int J Sports Med**, v. 23, n. 6, p. 445-452, Aug 2002.
- NORTJE, J.; MENON, D. K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Curr Opin Neurol**, v. 17, n. 6, p. 711-718, Dec 2004.
- NUNES, J.; EHRICH, M.; ROBERTSON, J. Toxicosis associated with dual oral exposure of rats to lead and trichloroethylene. **Toxicol Pathol**, v. 29, n. 4, p. 451-457, Jul-Aug 2001.
- OSBURN, W. O. et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 454, n. 1, p. 7-15, 1 out. 2006.
- OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochem Int**, v. 46, n. 8, p. 635-640, Jun 2005.
- OH-ISHI, S., KIZAKI, T., NAGASWA, J., IZAWA, T., KOMABAYASHI, T., NAGATA, N., SUZUKI, K., TANIGUCHI, N., OHNO, H. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content, and mRNA expression. In rat muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 24:326-332.
- OKONKWO, D. O. et al. Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury. **Neuroreport**, v. 10, n. 2, p. 353-358, Feb 5 1999.
- ORTENBLAD, N.S.; MADSEN, K.; DJURHUUS, M.S. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **The Am. J. Physiol.**, v.272, p.R1258 - R1263, 1997.
- OWUOR E.D., KONG A.N. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. **Biochem Pharmacol.** 2002 Sep;64(5-6):765-70.

OZA, A. M. et al. Patterns of survival in patients with Hodgkin's disease: long follow up in a single centre. **Ann Oncol**, v. 4, n. 5, p. 385-392, May 1993.

PARI, L.; MURUGAVEL, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. **Toxicology [S.l.]**, v. 234, n. 1-2, p. 44-50, May 5 2007.

PARROTT, J. et al. Hip displacement in spastic cerebral palsy: repeatability of radiologic measurement. **J Pediatr Orthop**, v. 22, n. 5, p. 660-667, Sep-Oct 2002.

PEDERSEN B.K., SALTIN B. (2006) Evidence for prescribing exercise therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports** 16(Suppl. 1), 3-63.

PETTUS, E. H. et al. Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 5, p. 507-522, Oct 1994.

PINEDA, D. A. et al. The role of neuropsychologic tests in the diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder. **Pediatr Neurol**, v. 36, n. 6, p. 373-381, Jun 2007.

PIÑEIRO-CARRERO, V. M.; PIÑEIRO, E.O. Liver. **Pediatrics.**, Elke Grove, v. 113, n.4, p.1097-1106, 2004.

POGOZELSKI, A. R. et al. p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7934, 2009.

POLIDORI C., CALO G., CICCOCIOPPO R., GUERRINI R., REGOLI D., MASSI M. Pharmacological characterization of the nociception receptor mediating hyperphagia: identification of a selective antagonist. **Psychopharmacology** 148:430-437, 2000.

POVLISHOCK, J. T. et al. Initiating mechanisms involved in the pathobiology of traumatically induced axonal injury and interventions targeted at blunting their progression. **Acta Neurochir Suppl**, v. 73, p. 15-20, 1999.

POWELL, K.E.; PAFFENBARGER, R. S.; JR. Workshop on Epidemiologic and Public Health Aspects of Physical Activity and Exercise: a summary. **Public Health Rep**, v. 100, n.2, p.118-126, 1985.

PROVAN, D.; KRENTZ, A. Gastroenterology. In: **Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigation**. (PROVAN, D.; KRENTZ, A.; Eds), 1<sup>st</sup> ed, Oxford University Press, New York, pp. 325-354, 2002;

QUINTANILHA A.,T. Effects of physical exercise and-or vitamin E on tissue oxidative etabolism. **Biochemical Society Transactions**. 12:403-404, 1984.

RADAK, Z. et al. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 72, n. 3, p. 189-194, 1996.

RAMOS, Jayr Jordão. **Exercício Físico na História e na Arte: do homem primitivo aos nossos dias**. São Paulo: **IBRASA**, 1982. 353p.

RAY, P. S. et al. Total elbow arthroplasty as primary treatment for distal humeral fractures in elderly patients. **Injury**, v. 31, n. 9, p. 687-692, Nov 2000.

- RAY, S. K.; DIXON, C. E.; BANIK, N. L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. **Histol Histopathol**, v. 17, n. 4, p. 1137-1152, Oct 2002.
- REILLY, P. L. et al. Patients with head injury who talk and die. **Lancet**, v. 2, n. 7931, p. 375-377, Aug 30 1975.
- RIOBO, N. A. et al. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. **Biochem J**, v. 359, n. Pt 1, p. 139-145, Oct 1 2001.
- ROBERTSON, C. L. Mitochondrial dysfunction contributes to cell death following traumatic brain injury in adult and immature animals. **J Bioenerg Biomembr**, v. 36, n. 4, p. 363-368, Aug 2004.
- ROSSIGNOL, J. F.; KEEFFE, E. B. Thiazolidines: a new class of drugs for the treatment of chronic hepatitis B and C. **Future Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 539-545, Oct 2008.
- ROSTAMI, E.; ENGQUIST, H.; ENBLAD, P. Imaging of cerebral blood flow in patients with severe traumatic brain injury in the neurointensive care. **Front Neurol**, v. 5, p. 114, 2014.
- ROTHSCHILD, M. A.; MAXEINER, H. [Spontaneous subdural hemorrhage of natural cause in metastatic renal cell carcinoma]. **Beitr Gerichtl Med**, v. 48, p. 223-227, 1990.
- R. SCOTT RECTOR, JOHN P. THYFAULT. Does Physical Inactivity Cause Nonalcoholic Fatty Liver Disease? **Journal of Applied Physiology** May 2011, DOI:10.1152/jappphysiol.00384.2011;
- SAATMAN, K. E. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 719-738, Jul 2008.
- SALMOND, C. H.; SAHAKIAN, B. J. Cognitive outcome in traumatic brain injury survivors. **Curr Opin Crit Care**, v. 11, n. 2, p. 111-116, Apr 2005.
- SERVAIS, C. HIM professionals key to patient safety. **J AHIMA**, v. 74, n. 8, p. 63-66, Sep 2003.
- SHERIFF, D. D.; ZHOU, X. Influence of cardiac output distribution on cardiac filling pressure during rest and dynamic exercise in dogs. **Am J Physiol**, v. 267, n. 6 Pt 2, p. H2378-2382, Dec 1994.
- SIEMS, W. G. et al. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. **Free Radic Biol Med [S.I.]**, v. 20, n. 2, p. 215-23, 1996.
- SILVA, P. M. et al. Changes in calcium-dependent membrane permeability properties in mitochondria of livers from arthritic rats. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 4, p. 443-450, Jun 2008.
- SILVA L.F., HOFFMANN M.S., RAMBO L.M., RIBEIRO L.R., LIMA F.D., FURIAN A.F., OLIVEIRA M.S., FIGHERA M.R., ROYES L.F. The involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylene-tetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. **J Neurol Sci**. 2011 Sep 15;308(1-2):35-40.
- SILVER, D. F.; HEYL, P. S.; LINFERT, J. B. Delayed uterine re-inversion: a unique symptom complex. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, n. 1, p. 378-379, Jul 2004.
- SILVER, J.; LEVI, R. Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. **Clin Nephrol**, v. 63, n. 2, p. 119-126, Feb 2005.
- SILVER, L.; GALLO, G. Extracellular Muscle Myosin II Promotes Sensory Axon Formation. **DNA Cell Biol**, v. 24, n. 7, p. 438-445, Jul 2005.
- SILVER, R. C. Clarifying the presence of posttraumatic stress symptoms following orthopaedic trauma. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 3, p. 673; author reply 673-675, Mar 2005.
- SILVERS, H. J.; GIZA, E. R.; MANDELBAUM, B. R. Anterior cruciate ligament tear prevention in the female athlete. **Curr Sports Med Rep**, v. 4, n. 6, p. 341-343, Dec 2005.

- SJODIN, L. et al. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> gradients evoked by acetylcholine and peptides in pancreatic acinar cells of the guinea-pig. **Pflugers Arch**, v. 433, n. 4, p. 397-402, Feb 1997.
- SMITH, M. Y. et al. Post-traumatic stress disorder in cancer: a review. **Psychooncology**, v. 8, n. 6, p. 521-537, Nov-Dec 1999.
- SMITH, R. M.; DUTHIE, R. B. Traumatic paraplegia in a child with minimal vertebral anomalies and its successful treatment by anterior spinal cord decompression. **Injury**, v. 25, n. 8, p. 551-552, Oct 1994.
- STIVER, S. I.; MANLEY, G. T. Prehospital management of traumatic brain injury. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 4, p. E5, Oct 2008
- STONE, J. R.; SINGLETON, R. H.; POVLISHOCK, J. T. Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. **Brain Res**, v. 871, n. 2, p. 288-302, Jul 21 2000.
- SULLIVAN, P. G.; THOMPSON, M. B.; SCHEFF, S. W. Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 160, n. 1, p. 226-234, Nov 1999.
- SUZUKI, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis. **Intern Med**, v. 42, n. 7, p. 552-553, Jul 2003.
- SOUZA, M.A. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, 50(4):811-823, 2009.
- STARKOV A.A., FISKUM G. Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. **J Neurochem**. 2003 Sep;86(5):1101-7.
- SULLIVAN, P.G., THOMPSON, M., SCHEFF, S.W. Cycloporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury, **Exp Neurol** 160:226-234, 1999.
- TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-84, Jul 13 1974.
- TIAN, R. et al. The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 3, p. 349-355, Feb 2013.
- TOLIAS, C. M.; BULLOCK, M. R. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 71-79, Jan 2004.
- TOPOL, Eric J. Tratado de Cardiologia. Rio de Janeiro. 2<sup>a</sup> edição. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 2005.
- TUBINO. M. J. G.; MOREIRA, S. B. Metodologia científica do treinamento desportivo. 13. ed. Rio de Janeiro: **Shape**, 2003.
- UGUCCIONI, G.; HOOD, D. A. The importance of PGC-1alpha in contractile activity-induced mitochondrial adaptations. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 2, p. E361-371, Feb 2011.
- VASCONCELOS, M.; URCUIOLI, P. J.; LIONELLO-DENOLF, K. M. When is a failure to replicate not a type II error? **J Exp Anal Behav**, v. 87, n. 3, p. 405-407, May 2007.
- VASCONCELOS, V. M.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. **Toxicon**, v. 50, n. 6, p. 740-745, Nov 2007.

VENDITTI, P. et al. Vitamin E supplementation modifies adaptive responses to training in rat skeletal muscle. **Free Radic Res**, v. 48, n. 10, p. 1179-1189, Oct 2014.

VINK, R. et al. Neuropeptide release influences brain edema formation after diffuse traumatic brain injury. **Acta Neurochir Suppl**, v. 86, p. 257-260, 2003.

WAGNER, J. R. et al. The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. **J Biol Chem**, v. 268, n. 25, p. 18502-18506, Sep 5 1993.

WALLBERG-HENRIKSSON, H., CONSTABL, S.H., YOUNG, D.A. and HOLLOSZY, J.O. Glucose transport in rat skeletal muscle: Interaction between exercise and insulin. **J. Appl. Physiol.**, 65, 909-913, 1998.

WARBURTON, D.E.; NICOL, C.W.; BREDIN, S.S. Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ**, 2006 Mar 14;174(6):801-9.

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

WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 5, p. 1791-1796, May 2000.

WINKLER, T. Possibilities to evaluate and diminish the effects of the trauma in spinal cord lesions. An experimental study in the rat. **Scand J Rehabil Med Suppl**, v. 30, p. 81-82, 1994.

XIONG, Y. et al. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 1, p. 23-34, Jan 1997.

XIN, X. et al. Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **J Plant Physiol**, v. 171, n. 2, p. 140-147, Jan 15 2014.

YOUNG, P. H. et al. Traumatic occlusion in fibromuscular dysplasia of the carotid artery. **Surg Neurol**, v. 16, n. 6, p. 432-437, Dec 1981.

YOUNG, T. B. Post-traumatic, delayed rupture of the colon without identifiable cause. **Injury**, v. 16, n. 5, p. 327-329, Mar 1985.

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

