



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O PAPEL DA ENZIMA  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase NO DÉFICIT  
COGNITIVO E NO EFEITO PROFILÁTICO INDUZIDO  
PELO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS O TRAUMATISMO  
CRÂNIO-ENCEFÁLICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Frederico Diniz Lima**

**Santa Maria, RS, Brasil 2009**

**O PAPEL DA ENZIMA Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase NO DÉFICIT  
COGNITIVO E NO EFEITO PROFILÁTICO INDUZIDO  
PELO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS O TRAUMATISMO  
CRÂNIO-ENCEFÁLICO**

---

**Por**

**Frederico Diniz Lima**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientador Luiz Fernando Freire Royes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**O papel da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no déficit cognitivo e no efeito  
profilático induzido pelo exercício físico após o Traumatismo  
Crânio-Encefálico**

elaborada por

**Frederico Diniz Lima**

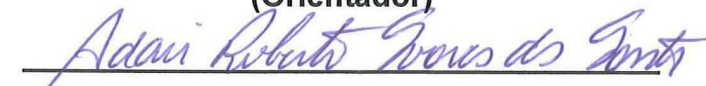
como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Luiz Fernando Freire Royes**

**(Orientador)**

  
\_\_\_\_\_  
**Adair Roberto dos Santos (UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Álvaro Reischak de Oliveira (UFRGS)**

**Santa Maria, 17 de setembro de 2009**

*“É o exercício sozinho que suporta o espírito e mantém o vigor da alma.”*

*Marcus Tullius Cícero (~ 65 a.C.)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Francisco e Eni, pelos exemplos de trabalho, dedicação e também por todo apoio, carinho, orações e por mostrarem sempre o caminho da honestidade e da verdade.

Aos meus irmãos, cunhado e cunhadas, Mauricio e Nívia, Ricardo e Sandra e Luciana e Gabriel, por toda a torcida e apoio, mesmo que distante.

Ao meu orientador e amigo Luiz Fernando pela oportunidade, ensinamentos, orientação, cafezinhos e conversas francas que nortearam esta etapa da minha vida.

Aos professores Carlos Mello, Maribel Rubin, Juliano Ferreira e Adair dos Santos, pela convivência e sugestões durante o trabalho.

Aos meus colegas e irmãos, Mauren, Leandro Ribeiro, Leonardo, Luiz, Mauricio e Leandro Retamoso por todos os momentos, trabalhos, ajuda, discussões científicas ou não e atividades fora do laboratório, pela amizade verdadeira.

Ao Mauro, à Ana Flávia, à Ana Paula Ferreira e à Danieli pela disposição sempre presente, pelos ensinamentos e conselhos desde o primeiro dia no laboratório.

Aos demais colegas, André, Gustavo, Felipe, Ana Paula Naspolini, Ariane, Anajara, Guilherme, Cristina, Mirian, Juliana, Silvia e Letícia pela ajuda e momentos agradáveis de convivência.

À direção e colegas do Colégio Jr Objetivo pelo apoio, aulas adiadas e pela torcida sem as quais, este objetivo não seria alcançado.

Agradeço a todos os amigos que não fazem parte da UFSM pelo incentivo, torcida e apoio.

À Cristina Krewer, maior incentivadora desta etapa, pelo carinho, orações e ajuda incondicionais.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente.

Por último, mas não menos importante, a Deus pelos dons da vida, e da inteligência e por ter me colocado no caminho de todas essas pessoas.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **O papel da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no déficit cognitivo e no efeito profilático induzido pelo exercício físico após o Traumatismo Crânio-Encefálico**

Autor: Frederico Diniz Lima  
Orientador: Luiz Fernando Freire Royes  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 17 de Setembro de 2009.

O Traumatismo crânio-encefálico (TCE) é uma das maiores causas de morte ou déficits cognitivos nos países industrializados. Apesar de os estudos indicarem que o estresse oxidativo e os déficits funcionais que ocorrem após TCE serem eventos inter-relacionados, os mecanismos que delineiam o desenvolvimento destes déficits cognitivos são, ainda, limitados. Neste contexto nós investigamos o envolvimento de marcadores de estresse oxidativo (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; TBARS e carbonilação protéica) e a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no aprendizado espacial um e três meses após um dano de percussão por fluído (FPI) em ratos. Os resultados revelaram que o FPI aumentou o tempo de latência e o número de erros no teste do labirinto de Barnes em um e três meses após FPI. Também encontramos aumento no conteúdo de TBARS e proteína carbonil no córtex parietal em um e três meses após FPI. Além disso, a análise estatística revelou uma diminuição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no córtex cerebral após FPI tempo dependente, sugerindo que o déficit cognitivo induzido pelo FPI se deva pela perda de funcionalidade de enzimas presentes na células como Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Perda esta induzida pelo aumento na geração de radicais livres após TCE. Apesar de estar envolvido no aumento da produção de espécies reativas ao Oxigênio (ERO), exercício físico tem sido utilizado na reabilitação de após TCE. Por outro lado, ainda são escassos na literatura estudos que evidenciam a especificidade dos mecanismos envolvidos na proteção induzida pelo exercício físico após TCE. Desta forma, investigamos se o treinamento físico protege contra o dano oxidativo bem como das alterações neuroquímicas representadas pela imunodeteção da subunidade  $\alpha$  e da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no córtex cerebral de ratos. Os resultados revelaram que o treinamento físico protegeu contra o dano oxidativo induzido por FPI. Além disso, o treinamento físico foi efetivo contra a inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e a diminuição dos níveis da sua subunidade  $\alpha$  após FPI. A correlação de Pearson revelou que a diminuição dos níveis catalíticos da subunidade  $\alpha$  da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase se correlaciona com o aumento dos marcadores de estresse oxidativo. Além disso, a proteção exercida pela atividade física contra os radicais livres induzidos por FPI tem relação com a manutenção do imunoc conteúdo da subunidade  $\alpha$ . A partir destes achados, sugere-se que a efetiva proteção exercida pelo exercício físico no dano neuronal causado induzido pelo TCE se deva pela proteção de alvos específicos a ação de radicais livres, como a enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.

Palavras-chaves: TCE; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; estresse oxidativo; Carbonilação protéica; TBARS; labirinto de Barnes; exercício físico.

## ABSTRACT

Dissertation of Master Degree  
Graduating Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **The role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme on cognitive deficit and in the prophylactic effect induced by exercise after Traumatic Brain Injury**

Author: Frederico Diniz Lima

Advisor: Luiz Fernando Freire royes

Date and place: Santa Maria, September, 17<sup>th</sup>, 2009.

Traumatic Brain Injury (TBI) is the major cause of death or cognitive deficits in industrialized countries. Although studies have indicated that the oxidative stress and functional deficits after TBI are connected events, the mechanisms that outline the development of these cognitive deficits are, still, limited. In this context, we investigated the involvement of oxidative stress markers (thiobarbituric acid reactive species; TBARS and protein carbonylation) and the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activity on the spatial learning after one and three months from a fluid percussion injury (FPI) in rats. The results revealed that FPI increase the latency of escape and the number of the errors on the Barnes Maze Test one and three months after FPI. We also found an increase of TBARS and protein carbonylation in parietal cortex after one and three months FPI. In addition, statistical analysis revealed a decrease of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activity in the parietal cortex after FPI (time-dependent). These results suggest that cognitive impairment following FPI may result, at least in part, from increase of two oxidative stress markers, protein carbonylation and TBARS that occurs concomitantly to a decrease in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Physical exercise, despite the involvement on the generation of the reactive oxygen species (ROS), is used on the rehabilitation of TBI. However, although the favorable effects of physical exercise on traumatic brain injury (TBI) patients is well known, the specific mechanisms involved in this protection after TBI has been limited. Thus, we investigated whether physical training protects against oxidative damage (measured by protein carbonylation and TBARS) and neurochemical alterations represented by immunodetection of alpha subunit and activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase after FPI in cerebral cortex of rats. The results revealed that physical training protected against oxidative damage induced by FPI. In addition, physical training was effective against Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activity inhibition and  $\alpha$  subunit level decrease after FPI. The Pearson correlation showed that the decrease of the catalytical levels of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme  $\alpha$  subunit is related with the increasing on oxidative stress markers. Moreover, the physical activity-related protection against free radicals induced by FPI links with maintenance of  $\alpha$  subunit immunocontent. These results suggest that the effective protection stimulated by physical exercise on the neuronal damage induced by TBI has connection with the protection of the specific targets from the free radicals action, like Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme.

Keywords: TBI; FPI; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; Oxidative damage; Protein carbonylation; TBARS; Barnes maze; Physical exercise.

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1. TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO.....	22
3.1.1 <i>Fisiopatologia específica do TCE</i> .....	23
3.1.1.1 Fluxo sanguíneo cerebral .....	23
3.1.1.2 Auto-regulação cerebrovascular e reatividade ao dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) .....	24
3.1.1.3 Vasoespasmo cerebral .....	25
3.1.1.4 Oxigenação cerebral .....	25
3.1.1.5 Disfunção metabólica cerebral .....	26
3.1.1.6 Inflamação .....	26
3.1.1.7 Edema .....	27
3.1.1.8 Necrose e apoptose .....	28
3.1.1.9 Excitotoxicidade e estresse oxidativo .....	28
3.2. ESTRESSE OXIDATIVO.....	29
3.2.1. <i>Radicais livres e espécies reativas</i> .....	29
3.2.2 <i>Defesas antioxidantes</i> .....	32
3.2.3 <i>Marcadores de estresse oxidativo</i> .....	33
3.2.3.1 Oxidação de proteínas .....	33
3.2.3.2 Peroxidação lipídica .....	34



3.3 ENZIMA Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPASE .....	36
3.3.1 Características estruturais da enzima Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	37
3.3.2 Características funcionais da enzima Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	38
3.3.3 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase e doenças do sistema nervoso central.....	39
3.4 MEMÓRIA .....	40
3.4.1 Tipos de memórias.....	41
3.4.2 Formação da memória .....	42
3.4.3 Hipocampo .....	43
3.4.4 Memória espacial .....	44
3.4.4.1 Teoria do mapeamento cognitivo .....	44
3.4.4.2 Teoria da memória operacional .....	44
3.4.4.3 Teoria das estratégias de ligação.....	45
3.5 EXERCÍCIO FÍSICO .....	45
3.5.1 Exercício físico, estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	46
3.5.2 Exercício físico e cognição .....	47
<b>4. CAPÍTULOS.....</b>	<b>49</b>
4.1 CAPÍTULO I - O PAPEL DA ENZIMA Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPASE NO DÉFICIT COGNITIVO E NO DANO OXIDATIVO APÓS TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO EXPERIMENTAL. ....	51
4.2 CAPÍTULO II - EFEITO PROFILÁTICO EXERCIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO: UMA ANÁLISE BIOQUÍMICA .....	57
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
6.1 CAPÍTULO I .....	76
6.2 CAPÍTULO II .....	77
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAT	Catalase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECG	Escala de Coma de Glasgow
ERN	Espécies reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERP	Potencial evocado relacionado à eventos
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPX	Glutationa Peroxidase
HPLC	Cromatografia líquida de alta definição
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL- 1 $\beta$	Interleucina 1 beta
KDa	Quilo Dalton
MDA	Malondialdeído
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NT	Neurotrofinas
PGE	Prostaglandinas
PKC	Proteína Quinase C
RL	Radical Livre

RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo crânio – encefálico
TNF - $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Escala de Coma de Glasgow	22
Figura 2 – Tipos de causas de TCE	23
Figura 3 – Dano oxidativo às macromoléculas	31
Figura 4 – Fases da Troca de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup>	36
Tabela 1 – Antioxidantes, nutrientes e funções	31

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

O traumatismo crânio-encefálico – lesão cerebral ou concussão (TCE) representa a maior causa mundial de mortalidade em indivíduos com até 45 anos (WERNER E ENGELHARD, 2007). Entre os traumatismos crânio-encefálicos, que recebem cuidados médicos, 80% podem ser classificados como leves, 10% como moderados e 10% como graves (BEGHI, 2003). Entre as causas do traumatismo estão acidentes de trânsito, mergulho em águas rasas, agressões, quedas e projéteis de armas de fogo (WERNER E ENGELHARD, 2007).

O TCE pode ser dividido em dois estágios: o dano primário, que envolve a agressão mecânica propriamente dita, e o dano secundário, que é imposto às células em minutos, horas e dias após o trauma. O dano secundário está relacionado com o aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios, disfunções na mitocôndria e na homeostase celular de cálcio, alteração no balanço iônico, depleção de ATP, eventos excitotóxicos e estresse oxidativo (POTTS, 2006; SAKELARIS et al., 2006; PALMER, 1993).

Em condições normais, até 2% do oxigênio consumido pela cadeia respiratória mitocondrial sofre redução monoelétrica, principalmente ao nível da coenzima Q, levando à produção do radical superóxido, que pode gerar espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989). Nas situações em que a produção de radicais livres (RL) na mitocôndria está aumentada ou os mecanismos antioxidantes estão exauridos, o acúmulo destas espécies reativas pode levar a alterações irreversíveis nas moléculas de DNA, lipídeos e proteínas da membrana, resultando em disfunção mitocondrial e morte celular (ANSARI et al., 2004; ANSARI et al., 2006). Neste contexto, recentes estudos têm evidenciado que na fase aguda do TCE, a geração de radicais livres pode causar instabilidade estrutural de muitos constituintes moleculares das células neuronais (SHAO et al., 2006).

O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido a sua alta demanda de oxigênio, intensa produção de radicais livres e altas quantidades de metais de transição (como o ferro), que podem catalisar a produção de radicais livres (ANSARI et al., 2008). Além disso, as membranas neuronais por serem ricas

em ácidos graxos poliinsaturados são importantes locais de reações de peroxidação lipídica (ZINK, 2001). Desta forma, uma perda na funcionalidade destas membranas, causada pelo aumento na produção de espécies reativas após o TCE pode ter um papel crítico nas alterações neurológicas que surgem após a lesão, como a perda de memória, os distúrbios de coordenação motora e a epilepsia pós-traumática (BEGHI, 2003; RINALDI E CONTI, 2003).

Dentre as diversas proteínas constituintes da membrana neuronal, destaca-se a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, que é particularmente sensível ao estresse oxidativo (JAMME et al., 1995; MOREL et al., 1998). Esta enzima é responsável pelo equilíbrio eletrolítico celular, pelo controle dos potenciais de repouso e pela modulação da liberação e captação de neurotransmissores (STAHL E HARRIS, 1986; ZHAN et al., 2004). Segundo Harmony (1968), uma disfunção na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode causar oscilações no potencial de membrana, levando a despolarizações prolongadas e/ou repetitivas, as quais são características de neurônios de indivíduos epiléticos. Além disso, recentes estudos têm evidenciado uma significativa correlação entre a inibição desta enzima e os déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (KONG et al., 2005; JOVICIĆ et al., 2008; BAGH, et al., 2008).

Cabe salientar ainda que, atualmente, poucos tratamentos são eficazes para combater a profunda e permanente amnésia de pacientes que sofreram TCE (MAAS, 2001; NARAIAN et al., 2002; TOLIAS E BULLOCK, 2004). Neste contexto, acredita-se que os exercícios físicos podem apresentar um potencial na prevenção e tratamento de danos traumáticos cerebrais (GRIESBACH et al., 2004; 2007), assim como em doenças neurodegenerativas (STUMMER et al., 1995; MATSON, 2005; MATSON & WAN, 2005; MATSON & MAGNUS, 2006) como a Doença de Parkinson (SMITH & ZIGMOND, 2003; CANNING et al., 2009; POTHAKOS et al., 2009) e a Doença de Alzheimer (COTMAN & BERCHTOLD, 2002; PÉREZ & CANCELA CARREL, 2008). Muitas das alterações que provocam o desenvolvimento dessas doenças ocorrem em áreas específicas como córtex cerebral e hipocampo e envolvem a ativação de famílias de moléculas neurotróficas como o fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF- Brain Derived Neurotrophic Factor) (NEEPER et al., 1995; COTMANN & BERCHTOLD, 2002), neurotrofinas 3, 4/5 e 6 (NT 3, NT 4/5 e NT 6 – Neurotrophic Factor) e fator de crescimento neuronal (NGF – Nerve Growth Factor) (CHAE & KIM, 2009). Estudos com modelos experimentais

têm mostrado um aumento das concentrações das proteínas neurotróficas e de seus fatores de transcrição associado à prática regular de atividade física (YING et al., 2005; GRIESBACH et al., 2009). O exercício físico aumenta os níveis de proteína e ácido desoxiribonucleico mensageiro (RNAm), do Fator Neurotrófico Derivado de Encéfalo – BDNF (NEEPER et al., 1995; COTMAN & BERCHTOLD, 2002; GRIESBACH et al., 2004a) assim como de NT-3 no hipocampo de ratos, em córtex e cerebelo (YING et al., 2003; PATZ & WAHLE, 2004). Adicionalmente, o exercício protege os neurônios de vários tipos de insultos (KAO et al., 2009), pois o BDNF promove neurogênese em adultos (LEE & SON, 2009) e aumenta a eficácia sináptica (TYLER & POZZO-MILLER, 2001; TYLER et al., 2006). É sabido que a atividade física aumenta as concentrações de RNAm de NGF e induz o aumento da expressão gênica de neurotrofinas, causando neuroproteção à isquemia neuronal (DING et al., 2004). O exercício físico pode estar também envolvido na melhoria da memória e do aprendizado espacial por modulação da neurogênese no hipocampo (DURING E CAO, 2006; FABEL et al., 2003; van PRAAG et al., 1999), redução do estresse oxidativo (RADAK et al., 2006; OGONOVSKY et al., 2005) e favorecimento da vascularização cerebral (ISAACAS et al., 1992).

Apesar de estar bem descrito na literatura que a produção excessiva de radicais livres e a diminuição ou exaustão do sistema antioxidante são eventos que podem levar a diversas alterações neurológicas após o TCE (ANSARI et al., 2008), ainda são escassos na literatura os estudos que relacionam, de uma forma direta e objetiva o envolvimento da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, bem como da produção de radicais livres nas alterações de ordem psicológica e/ou cognitiva após um trauma (SALMOND E SAHAKIAN, 2005; COHEN et al., 2007).

Considerando que o dano oxidativo a proteínas constituintes da membrana neuronal como a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (LEES, 1991; BOLDYREV et al., 1995) pode ter papel crítico em alterações neurológicas que surgem após o TCE (POTS et al., 2006), é de grande interesse estudar se a alteração na atividade desta enzima após o TCE está relacionada com a geração de radicais livres bem como com o déficit cognitivo. Além disso, apesar de a literatura mostrar o importante papel exercido pela atividade física no tratamento de danos traumáticos cerebrais (BOHANNON, 1993), ainda não está totalmente compreendido se as adaptações do tecido cerebral pelo exercício físico anterior aos traumas, podem exercer efeito profilático contra os efeitos deletérios induzidos pelo TCE.



---

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo investigar a influência do TCE, em diferentes períodos de tempo, no aprendizado espacial, na geração de radicais livres e na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Além disso, este trabalho teve como objetivo verificar o possível efeito profilático do exercício físico neste modelo de TCE.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados, convém dividi-los:

#### **Capítulo I**

1. Investigar as conseqüências do TCE no desempenho do teste de aprendizado espacial em ratos, um e três meses após o trauma.
2. Avaliar o conteúdo de proteína carbonil e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex cerebral de ratos, um e três meses após TCE.
3. Acompanhar o efeito do tempo na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase após o TCE

## **Capítulo II**

1. Pesquisar o efeito do exercício físico prévio sobre a quantidade de proteína carbonil e TBARS no córtex cerebral de ratos após TCE.
2. Verificar se o exercício físico prévio protege contra a diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase após TCE.
3. Verificar o efeito do TCE e do exercício físico sobre a quantidade e a subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em ratos.
4. Pesquisar se existe uma correlação entre a atividade e o conteúdo da subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase com a quantidade de proteína carbonil e a produção de TBARS em ratos sedentários e treinados após TCE.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Traumatismo Crânio Encefálico**

O Traumatismo Crânio Encefálico (TCE) é um dos maiores eventos patológicos da civilização moderna, em pessoas de até 45 anos, e pode promover sérios distúrbios neurológicos, ou até o óbito (BEGHI, 2003; LANGLOIS et al, 2003). Os pacientes que sobrevivem a esta condição geralmente apresentam anormalidades neurológicas, incluindo déficits cognitivos crônicos, como problemas de atenção, de aprendizado e memória (COHEN, et al, 2007; SALMOND & SAHAKIAN, 2005). Além disso, a severidade do TCE é definida pelo resultado da avaliação das funções neurológicas do paciente por meio da escala de Coma de Glasgow (ECG), largamente utilizada para este fim (MARCIN E POLLACK, 2002), e assim o TCE é classificado como “Leve” (ECG de 13 a 15), “Moderado” (ECG de 9 a 12) e “Severo ou grave” (ECG < 9).

O TCE pode ser ainda classificado como “dano cerebral focal” (dano por contato), que resulta em contusão, laceração e hemorragia intracranial ou “dano cerebral difuso” que promove – aceleração/desaceleração (CHEN et al., 2004; NORTJE E MENON, 2004; MARSHALL, 2000). O TCE também pode ser dividido em dois estágios: o “dano primário”, que envolve a agressão mecânica propriamente dita, e o “dano secundário”, que é imposto às células após minutos, horas ou dias e está relacionado com o aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios, disfunções na mitocôndria, homeostase celular de cálcio, desbalanço iônico, depleção de ATP, cascata de eventos excitotóxicos e estresse oxidativo (POTTS, 2006; SAKELARIS et al., 2006; PALMER, 1993).

### 3.1.1 Fisiopatologia específica do TCE

#### 3.1.1.1 Fluxo sanguíneo cerebral

Pesquisas mostram que isquemia cerebral focal ou global ocorre frequentemente após o TCE e sua presença está associada a danos neurológicos muito significativos como morte ou estado vegetativo (BOUMA et al., 1998; COLE et al., 2004; INOUE et al., 2005; OVERGAARD E TWEED, 1983).

**Tabela 1 -** Escala de coma de Glasgow

	<b>Resposta</b>	<b>Resposta modificada para lactentes</b>
<b>Escore</b>	<b>Abertura ocular</b>	
<b>4</b>	Espontânea	Espontânea
<b>3</b>	Ao estímulo verbal	Ao estímulo verbal
<b>2</b>	Ao estímulo doloroso	Ao estímulo doloroso
<b>1</b>	Ausente	Ausente
	<b>Melhor resposta motora</b>	
<b>6</b>	Obedece comando	Movimentação espontânea
<b>5</b>	Localiza dor	Localiza dor (retirada ao toque)
<b>4</b>	Retirada ao estímulo doloroso	Retirada ao estímulo doloroso
<b>3</b>	Flexão ao estímulo doloroso (postura decorticada)	Flexão ao estímulo doloroso (postura decorticada)
<b>2</b>	Extensão ao estímulo doloroso (postura descerebrada)	Extensão ao estímulo doloroso (postura descerebrada)
<b>1</b>	Ausente	Ausente
	<b>Melhor resposta verbal</b>	
<b>5</b>	Orientado	Balucia
<b>4</b>	Confuso	Choro irritado
<b>3</b>	Palavras inapropriadas	Choro à dor
<b>2</b>	Sons inespecíficos	Gemido à dor
<b>1</b>	Ausente	Ausente

TCE severo (escore Glasgow: 3-8); TCE moderado (escore Glasgow: 9-12); TCE leve (escore Glasgow: 13-15).

Figura 1 – Escala de Coma de Glasgow

A diferença entre a isquemia cerebral e o TCE, é que a primeira induz a um estresse metabólico e perturbações iônicas e a segunda faz com que o tecido cerebral sofra danos estruturais de células neuronais, astrócitos e micróglia e danos

nas células endoteliais e micro vascularização cerebral (BRAMLETT e DIETRICH, 2004; IOUNE et al., 2005; OVERGAARD E TWEED, 1983). Desta forma, enquanto o fluxo sanguíneo cerebral médio em adultos jovens é de 54ml/100g/min, um paciente com TCE pode desenvolver danos teciduais irreversíveis com 15ml/100g/min. Em pacientes com isquemia o limiar é de 5 a 8,5ml/100g/min. (CUNNINGHAM et al., 2005).

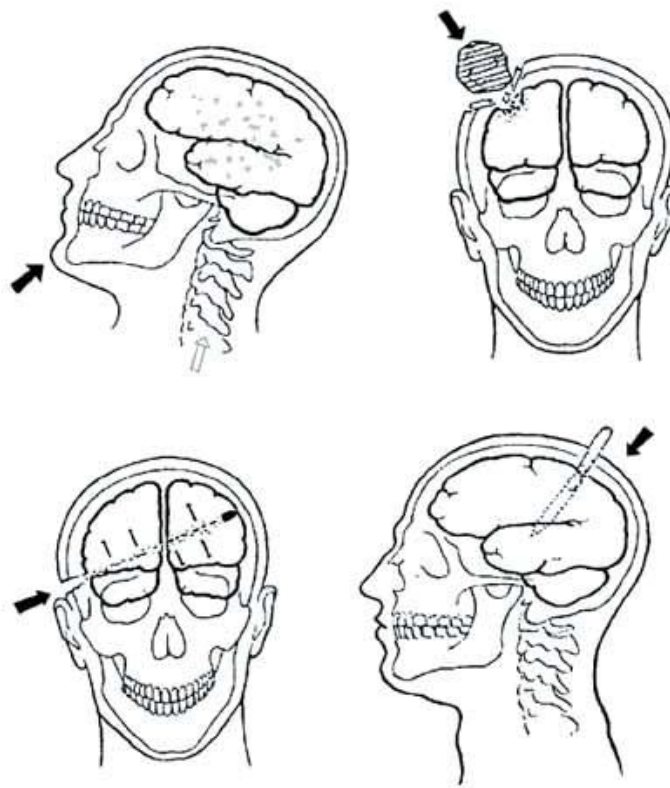


Figura 2 – Tipos de causas de TCE.

### 3.1.1.2 Auto-regulação cerebrovascular e reatividade ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

Um dos mecanismos que fornecem, em qualquer tempo, uma irrigação cerebral adequada é a auto-regulação cerebrovascular, responsável pela dilatação ou constrição cerebrovascular em resposta ao aumento ou diminuição na pressão de perfusão cerebral (WERNER & ENGELHARD, 2007).

A pressão de perfusão cerebral pode ser diminuída ou abolida em muitos pacientes, mas pode estar presente imediatamente após o trauma, ou com o passar tempo, pode haver uma falha na irrigação cerebral breve ou persistente tanto em traumas leves, moderados ou graves (ENEVOLDSEN E JENSEN, 1978; HAUERBERG et al., 1998; HLATKY et al., 2002; JEAGER et al., 2006; LAM et al., 1997; LANG et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003).

Outro mecanismo responsável pela irrigação cerebral é a reatividade ao CO<sub>2</sub> (como a dilatação ou constrição cerebrovascular em resposta à hipo ou hipercapnia), que parece ser um fenômeno mais robusto, apesar de estar diminuída nos primeiros estágios após o trauma (WERNER E ENGELHARD, 2007).

#### 3.1.1.3 Vasoespasmo cerebral

O vasoespasmo cerebral ocorre em mais de um terço dos pacientes com TBI e indica a severidade do dano causado ao cérebro, determinando o estado definitivo do paciente (LEE et al., 1997; OERTEL et al., 2005). Dentre os principais mecanismos envolvidos neste trauma, pode-se destacar a despolarização crônica da musculatura lisa através da redução da atividade dos canais de potássio (SOBEY, 2001), liberação de endotelina com a redução de óxido nítrico (ZUCCARELO et al., 1998), depleção do GMP cíclico da musculatura vascular lisa (TODO et al., 1998), potenciação de vasoconstrição induzida por prostaglandinas (ARMSTEAD, 2006) e formação de radicais livres (DeWITT e PROUGH, 2003; McLAUGHLIN e MARION, 1996).

#### 3.1.1.4 Oxigenação cerebral

Uma das características do TCE é um desbalanço entre o transporte e o consumo de oxigênio, que pode acontecer por vários mecanismos, entretanto a hipóxia é o resultado final mais comumente descrito (WERNER e ENGELHARD, 2007). Um limite de 15 a 10 mm Hg é freqüentemente associado com o infarto



tecidual neuronal em pacientes com TCE (JOHNSTON et al., 2005; ROSE et al., 2006). Entretanto, a ocorrência de danos teciduais pela privação de oxigênio é possível mesmo com a pressão intracraniana e a pressão de perfusão cerebral normais (STIEFEL et al., 2006).

#### 3.1.1.5 Disfunção metabólica cerebral

Após o TCE, há uma redução considerável tanto no metabolismo cerebral, como no seu estado energético (CUNNINGHAM et al., 2005; CLARK et al., 1997; DIRINGER et al., 2000; GLENN et al., 2003), o que está diretamente relacionado com a severidade do dano primário e indica o tipo de resultado que o paciente poderá mostrar (WU et al., 2004). Esta redução leva a uma disfunção na mitocôndria com diminuição na taxa respiratória e na produção de ATP e aumento na concentração de íons cálcio no interior da mitocôndria (TAVAZZI et al., 2005; VERWEIJ et al., 2000).

#### 3.1.1.6 Inflamação

Respostas teciduais inflamatórias e imunológicas complexas são induzidas pelo TCE, similares às que ocorrem no dano isquêmico. Tanto o dano primário quanto o secundário ativam a liberação de mediadores celulares que incluem citosinas, prostaglandinas e radicais livres (GOPCEVIC et al., 2007). Leucócitos polimorfonucleados se aderem à membrana endotelial falha como mediadores de moléculas de adesão, que penetram junto com macrófagos e células T (ZHANG et al., 2006). As principais citocinas liberadas são a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) (FINFER & COHEN, 2001; MUSSACK et al., 2002; GOPCEVIC et al., 2007). A interleucina-8 (IL-8) é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patofisiologia do TCE. Ela é produzida por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, células endoteliais, astrócitos e células da micróglia. A liberação de IL-8 é estimulada por outras

citocinas, como a IL-1, além de fatores como a hipóxia, a isquemia e a reperfusão (mecanismos básicos do estresse oxidativo pós-traumático). Estudos em humanos também sugerem que os níveis plasmáticos de IL-8 podem ser parâmetros preditivos de mortalidade em TCE grave isolado (MUSSACK et al., 2002; GOPCEVIC et al., 2007). Já a ativação dos astrócitos e da micróglia, logo após o trauma, promove a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , levando a uma liberação adicional de citocinas e à produção de mediadores do sistema imune periférico. Estudos clínicos têm demonstrado níveis elevados de TNF $\alpha$  em pacientes com TCE (FINFER & COHEN, 2001; CRESPO et al., 2007). Em relação a IL-6, há descrições de níveis elevados no plasma e no líquido após o TCE (FINFER & COHEN, 2001). Além disso, a IL-6, por estimular a secreção de vasopressina, pode estar envolvida na patogênese da síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético (ADH - antidiuretic hormone) após o TCE. (BONDANELLI et al., 2005)

#### 3.1.1.7 Edema

O edema ocorre freqüentemente após o TCE e a sua classificação está relacionada com o dano estrutural ou água e desbalanço osmótico induzido pelos danos primário e secundário (WERNER e ENGELHARD, 2007). A interrupção mecânica, ou ainda os danos na camada endotelial dos vasos cerebrais (barreira hemato-encefálica), classifica o “edema vasogênico cerebral”, no qual observa-se um fluxo de íons e proteína para o meio intersticial causando acúmulo de água e aumentando, anatomicamente, o volume do espaço extracelular (DeWITT et al., 2003; UTERBERG et al., 2004). Já no “edema citotóxico cerebral”, existe acúmulo de água no espaço intracelular de neurônios, astrócitos e micróglia e perturbação da parede endotelial vascular, gerando aumento da permeabilidade de íons e falha nas bombas iônicas, em consequência da depleção energética. (STIEFEL et al., 2005; UTERBERG et al., 2004). Tanto o edema vasogênico quanto o citotóxico, que parece ser mais freqüente, estão relacionados com aumento na pressão intracraniana e eventos isquêmicos secundários (MARMAROU, A.; et al., 2000, MARMAROU, A.; et al., 2006).

### 3.1.1.8 Necrose e apoptose

Evidências crescentes têm demonstrado que, depois do TCE, dois tipos de morte celular podem ocorrer: necrose e apoptose (PINEDA et al., 2004; WERNER e ENGELHARD, 2007). A necrose, é evidente após o TCE, pois ocorre em resposta a um dano mecânico severo ou mesmo a um dano tecidual após hipóxia ou isquemia, que tem como consequência a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios e falha no metabolismo celular. Já a apoptose ocorre horas após o trauma. Neurônios que sofrem apoptose estão, em um período pós traumático curto, morfológicamente normais e com sua produção de ATP e potenciais de membrana regulares. O processo de apoptose requer gasto energético e ocorre por ativação e desativação de caspases (CHOI, 1996; ELDADAH e FADEN, 2000).

### 3.1.1.9 Excitotoxicidade e estresse oxidativo

A excitotoxicidade é um ponto importante após TCE na medida em que existe uma grande e rápida liberação de neurotransmissores excitatórios, particularmente o glutamato, após o trauma (BULLOCK et al., 1998; ROBERTSON et al., 2001). Um aumento na quantidade de neurotransmissores excitotóxicos e/ou uma diminuição na quantidade de neurotransmissores inibitórios após um TCE resulta em uma grande estimulação dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos com consequente fluxo aumentado de íons cálcio, sódio e potássio (FLOYD et al., 2005; YI e HAZEL, 2006).

Os íons cálcio são os maiores sinalizadores em neurônios e uma pequena elevação na sua concentração intracelular livre é suficiente para uma função cerebral normal como na transmissão sináptica e no aprendizado e na memória. Entretanto, a elevação por tempo maior que o necessário para estas atividades fisiológicas está ligada a produção de radicais livres e morte celular (SCHWARZBACG et al., 2006) e também a problemas de memória com o aumento da idade (RAZA et al., 2007; TONKIKH et al., 2006). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, conseqüentemente a diminuição ou exaustão

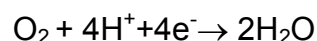
do sistema antioxidante endógeno são eventos que levam a morte neuronal após o TCE. Além disso, proteínas que apresentam resíduos de aminoácidos histidina, arginina e lisina, são os alvos imediatos do estresse oxidativo causados pelas EROs (DEAN et al., 1997). Neste contexto, recentes estudos têm evidenciado uma significativa correlação entre a carbonilação protéica (DEAN et al., 1997) e a diminuição da funcionalidade de enzimas presentes na célula, como  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (DALLE-DONNE et al., 2003) sugerindo que mudanças oxidativas desta enzima podem fazer com que as suas moléculas percam a habilidade de interação e, com isso, diminuam sua taxa de hidrólise.

### 3.2. Estresse oxidativo

#### 3.2.1. Radicais livres e espécies reativas

Do ponto de vista químico, um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir sob forma independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados (DeI MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Nos organismos aeróbicos os produtos do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas são armazenados para posterior oxidação no Ciclo de Krebs e na Cadeia de Transporte de elétrons para a formação do ATP (POWERS E HOWLEY, 2000). Ao final deste processo que ocorre na mitocôndria, a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), junto com quatro elétrons e quatro hidrogênios ( $\text{H}^+$ ) em água.

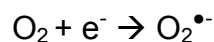


O oxigênio utilizado na cadeia de transporte de elétrons representa de 95 a 98% do processado pela mitocôndria, onde o restante (5 a 2%) é reduzido univalentemente, processo onde uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos ao mesmo tempo em que o outro continua

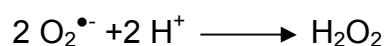
desemparelhado produzindo, assim, intermediários altamente reativos – as espécies reativas de oxigênio, que constituem os radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A molécula de oxigênio é, em consequência de sua configuração eletrônica, um receptor universal de elétrons formando, com isso, intermediários tóxicos reativos (MENEHINI, 1978) como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ), classificados como RL, pois possuem elétrons desemparelhados, e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é classificado como Espécie Reativa de Oxigênio (ERO), pois não possui este desemparelhamento (FISHER, 1987).

Essas EROs têm meia-vida curta e têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa captando um elétron de outro átomo ou molécula, que por sua vez se torna uma molécula radicalar. Um elétron desemparelhado pode se associar com átomos isolados (hidrogênio ou íons metálicos) ou ainda com moléculas (açúcares, lipídios, proteínas e DNA) o que resulta em um processo de relevância biológica, uma vez que promove alterações estruturais importantes (HALLIWELL, 1987; SLATER, 1984). Os RL participam como componentes fundamentais em muitas doenças, o que mostra o grande dano oxidativo causado por eles (HALLIWELL, 1987).

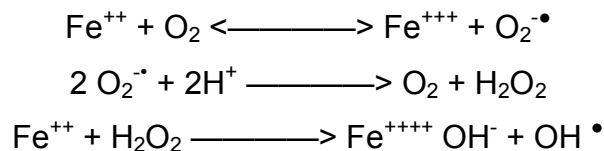
O primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular para a formação de água é o radical superóxido, o qual é pouco reativo, entretanto possui uma grande capacidade de geração de radicais secundários altamente tóxicos (GRISHAM et al., 1986; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; MCCORD et al., 1985; WALKER et al., 1987).



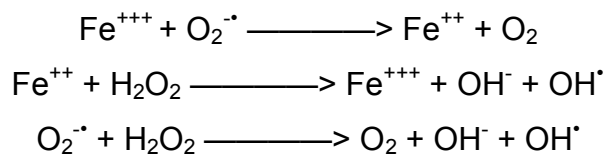
A partir deste elemento podem se formar outras espécies ativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) (ESTERBAUER et al., 1986; PRYOR, 1984). O  $H_2O_2$  é gerado a partir do superóxido por meio de dismutação, sendo esta reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (PAL YU, 1994).



Quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil, que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e, assim, influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (HEUNKS, 1999). Este radical pode ser formado pela reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com íons cobre ou ferro pela chamada reação de Fenton.



Os metais de transição podem catalisar a reação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , levando à produção de radical hidroxil. Esta é conhecida como reação de Haber-Weiss, e catalisada pelo cobre ou ferro, que pode ser oriundo da ferritina, hemoglobina ou mioglobina (WERNIS & LUCHESI, 1990).



Além das EROs, existem também as Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN), que são formadas tanto na mitocôndria, quanto no citosol, sendo que as mais representativas são o óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), presente no citosol e na mitocôndria, o  $\text{NO}^{\bullet}$  é gerado a partir da arginina (RIOBO et al., 2002). Este radical é essencial para vasorregulação, agregação plaquetária e neurotransmissão, mas em excesso inibe a citocromo-c oxidase levando à conseqüente formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (FORFIA et al., 1999). Entretanto, o  $\text{ONOO}^-$  é formado a partir de uma reação controlada entre  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (RADI et al., 1994) e ele pode se difundir para o meio intra ou extracelular, e então promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (BECKMAN et al., 1996). Além disso, o  $\text{ONOO}^-$  pode inibir a cadeia respiratória, levando a morte neuronal e produzir íons nitrônio, que são capazes de nitrificar resíduos de tirosina (BECKMAN et al., 1996). Ambas ERO e ERN são espécies necessárias para um bom funcionamento do organismo, entretanto, quando são produzidas em excesso ou

quando as defesas antioxidantes estão diminuídas, pode ocorrer dano celular, devido ao estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

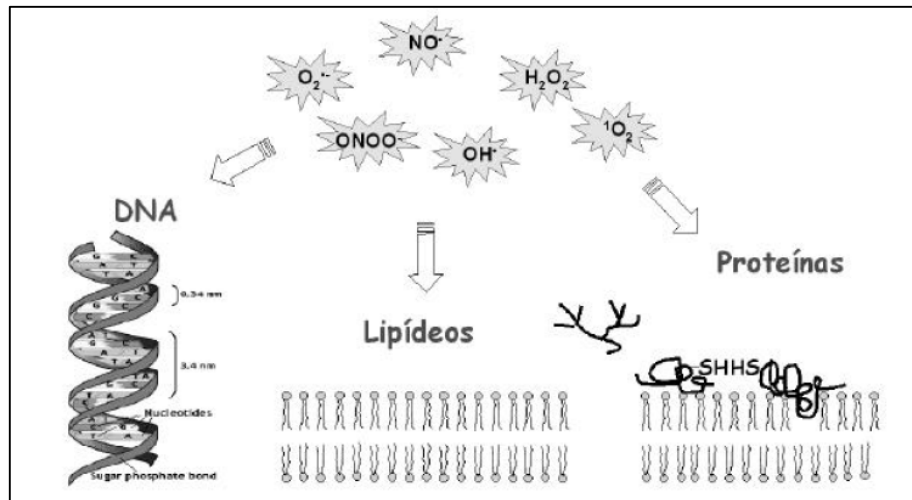


Figura 3 - Dano oxidativo às macromoléculas biológicas (Torres, 2003).

Além da mitocôndria, existem outras rotas bioquímicas na célula que também geram a produção de espécies reativas como a  $\beta$ -oxidação (GODIN & WOHAIEB, 1988), oxidação de amino ácidos, ativação do citocromo P-450 e a degradação da xantina à ácido úrico (YU, 1994; CHANCE et al., 1979).

### 3.2.2 Defesas antioxidantes

Em situações fisiológicas normais, o metabolismo forma EROs, continuamente, devido a característica reativa do oxigênio. Para combater os seus efeitos nocivos, todas as células possuem mecanismos de defesa antioxidante (HALLWELL e GUTTERIDGE, 1999), os quais são classificados em “enzimáticos”, formados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) e “não-enzimáticos”, que por serem exógenos necessitam ser absorvidos pela alimentação e são divididos em vitaminas lipossolúveis (A, E e  $\beta$ -caroteno), vitaminas hidrossolúveis (C e do complexo B), os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio) e os flavonóides (derivados de plantas).

<b>Componentes (localização na célula)</b>	<b>Nutrientes envolvidos</b>	<b>Função</b>
SOD (citosol)	Cobre e zinco	Enzima que converte superóxido à peróxido de hidrogênio.
SDO (mitocôndria)	Manganês e zinco	Enzima que converte superóxido à peróxido de hidrogênio.
GPX (citosol)	Selênio	Enzima que converte peróxido de hidrogênio em água.
CAT (citosol)	Ferro	Enzima que converte peróxido de hidrogênio em água.
Ac. Ascórbico (citosol)	Vitamina C	Reage com vários tipos de RL.
A - Tocoferol	Vitamina E	Quebra a reação em cadeia de peroxidação de ácidos graxos.
$\beta$ – caroteno	$\beta$ – caroteno	Evita a reação em cadeia da peroxidação de ácidos graxos.

Tabela 1 – Antioxidantes, nutrientes e funções.

### 3.2.3 Marcadores de estresse oxidativo

#### 3.2.3.1 Oxidação de proteínas

As proteínas, particularmente os resíduos de aminoácidos histidina, arginina e lisina, são os alvos imediatos do estresse oxidativo causados pelas EROs e, como



conseqüência, surgem danos à estrutura protéica levando a alterações na sua atividade biológica. No caso de enzimas, pode ocorrer modificação na atividade catalítica, bem como prejuízo no transporte ativo através das membranas celulares e com isso citólise (DEAN et al., 1997).

A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (BERLETT & STADMAN, 1997; BEAL, 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). O conteúdo de grupos carbonil ( $>C=O$ ) nas proteínas pode ser medido após a reação deste grupo com 2,4-dinitrofenilhidrazina (PRATICÒ & DELANTY, 2000) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, que pode ser detectada e quantificada por espectrofotometria ou por ensaios imunoquímicos (LEVINE, 2002). Segundo o mesmo autor, a origem e a progressão de várias doenças estão ligadas a modificações oxidativas das proteínas por EROs, o que implica na etiologia ou progressão de várias doenças (LEVINE, 2002) e de acordo com Dean et al. (1997), o estresse oxidativo induz à Carbonilação protéica.

### 3.2.3.2 Peroxidação lipídica

A lipoperoxidação é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989), uma vez que os ácidos graxos poliinsaturados são alvos destas espécies e, durante o estresse oxidativo são atacados levando a uma cadeia de reações químicas chamadas peroxidação lipídica (URSO e CLARKSON, 2003).

A membrana plasmática é um alvo importante dos radicais livres e em decorrência da peroxidação lipídica ocorrem alterações na sua estrutura e na sua permeabilidade. Como conseqüência, há perda da seletividade na troca iônica e conseqüente liberação do conteúdo de organelas, como por exemplo das enzimas hidrolíticas dos lisossomas, além da formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, a peroxidação lipídica pode ser iniciada por qualquer radical primário que tenha suficiente reatividade para

extrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno do ácido graxo poliinsaturado. Além disso, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar  $Fe^{3+}: Fe^{2+}$  no meio (FERREIRA & MATSUBARA 1997).

A peroxidação lipídica produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos, como o malondialdeído (MDA), dienos conjugados e 4-hidroxinonenal (PUNCHARD & KELLY, 1996). Desta forma, esta reação pode ser estimada pela medida de seus produtos, especialmente o MDA, e é utilizada para medir indiretamente a produção de RL através de HPLC, espectrofotometria ou espectrofluorescência (HALLIWELL e CHIRICO, 1993; HAN et al., 2000). A maioria dos estudos tem utilizado a técnica de quantificação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) como medida indireta de liperoxidação (FIGHERA et al., 2003; MALFATTI et al., 2003; MARISCO et al., 2003; ROYES et al., 2003). A quantificação de TBARS é um método que mede a lipoperoxidação pela reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA que é um biomarcador de estresse oxidativo, e é um dos últimos produtos liberados no processo de lipoperoxidação causando dano celular. Estudos recentes demonstram que a lipoperoxidação está envolvida com alterações na atividade da enzima  $Na^+, K^+$ -ATPase (MOREL et al., 1998; JAIN & LIM, 2001; KAUR et al., 2001).

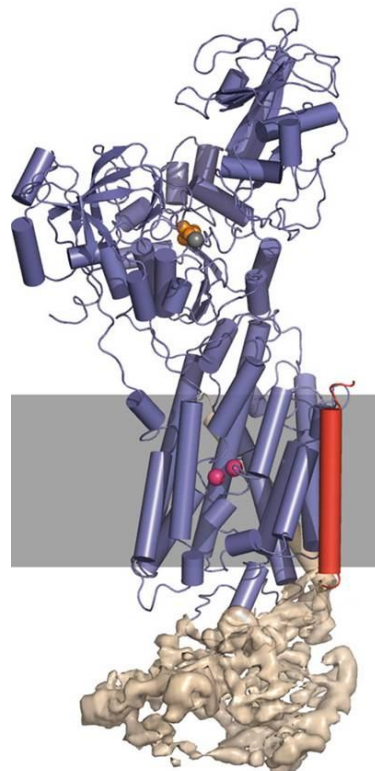
De acordo com Meerson (1982), a lipoperoxidação pode causar alguns efeitos sobre a membrana como o aumento ou diminuição da atividade das enzimas, canais iônicos ou receptores ligados a ela por meio de mudanças no microambiente lipídico, alteração da permeabilidade nos canais da membrana, inclusive com a formação de novos canais, inativação irreversível de proteínas e fosfolipídios através de ligações cruzadas e perda das propriedades funcionais pela oxidação de grupos – SH nos sítios ativos.

Estudos indicam que o estresse oxidativo gerado pelo traumatismo crânio-encefálico está ligado à peroxidação lipídica (HALL et al., 2004; INCI et al., 1998; TYURIN et al., 2000) e com níveis de TBARS significativamente elevados entre 3 a 96 horas após o TCE e com picos entre 12 e 72 horas (ANSARI et al., 2008; SHAO et al., 2006).

### 3.3 Enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Muitos processos considerados fundamentais para o funcionamento das células como a geração do potencial de membrana, contração celular ou remoção de íons tóxicos do seu interior são realizados pelas ATPases do tipo P. Essas enzimas são proteínas integrais de membrana, com muitos domínios transmembrana e com massa molecular variando entre 70 a 150 kDa. A família das ATPases do tipo P são divididas em cinco sub-grupos (I a V) e a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase faz parte do sub-grupo II, apresentando um estado intermediário fosforilado. As enzimas pertencentes a este subgrupo são responsáveis pela formação e manutenção do potencial de membrana nas células animais e vegetais, e também, pelo transporte secundário de açúcar, aminoácidos, pequenas moléculas e íons (JORGENSEN, 1982; KÜHLBRANDT, 2004; RICE et al., 2001; SWEADNER e DONNERT, 2001).

A enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase foi descoberta por Jeans Skou em 1947, quando observava uma enzima que hidrolisava ATP somente na presença de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, além de Mg<sup>2+</sup> (GUYTON e HALL, 1997; STRYER, 1996). A contínua operação desta enzima consome um terço do ATP produzido por um animal em repouso (JORGENSEN, 1996; LEHNINGER et al., 2006; STRYER, 1996).



### 3.3.1 Características estruturais da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

A enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase possui estrutura oligomérica com duas subunidades ligadas não-covalentemente – “α” e “β” (CORNELIUS, 1991) e uma pequena subunidade “γ”.

A subunidade catalítica da enzima é a subunidade “α”, que possui dez domínios transmembrana (M1 – M10), com sítios de ligação para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATP e para seu inibidor específico, a ouabaína, e ainda domínios citoplasmáticos de ligação de nucleotídeos (N) – onde se liga o ATP, além dos domínios de fosforilação (P), localizados entre os segmentos transmembranares M4 e M5, e do atuador (A), formado pela porção N-terminal da cadeia e uma inserção entre os segmentos transmembranares M2 e M3 (GUYNN et al., 2002; KAWAKAMI et al., 1985). Sabe-se também que os sítios de ligação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> se encontram na região transmembranar e os sítios catalíticos na porção citoplasmática (JORGENSEN et al., 2003).

A subunidade “β” é uma glicoproteína integral, possuindo apenas um segmento transmembrana e a sua importância está relacionada à formação e maturação da holoenzima, translocação e inclusão da enzima à membrana, regulação conformacional e na atividade da subunidade “α”, além de estar envolvida na afinidade por Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (KAWAKAMI e NAGANO, 1988; KAWAKAMI et al., 1985; YU et al., 2003).

De acordo com Béguin et al. (1997) e Lowndes et al. (1984) a subunidade “γ” é um pequeno polipeptídeo denominado “componente proteolítico” e parece não ser essencial para a maturação estrutural ou funcional da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Este polipeptídeo faz parte da família de proteínas FXDY, que possuem baixo peso molecular (~10 kDa) e um domínio transmembrana e regulam a atividade desta enzima no coração, músculo esquelético e a subunidade “γ” parece regular a enzima no rim e pode estar envolvida no sítio de ligação da ouabaína (KÜHLBRANDT et al., 2004).

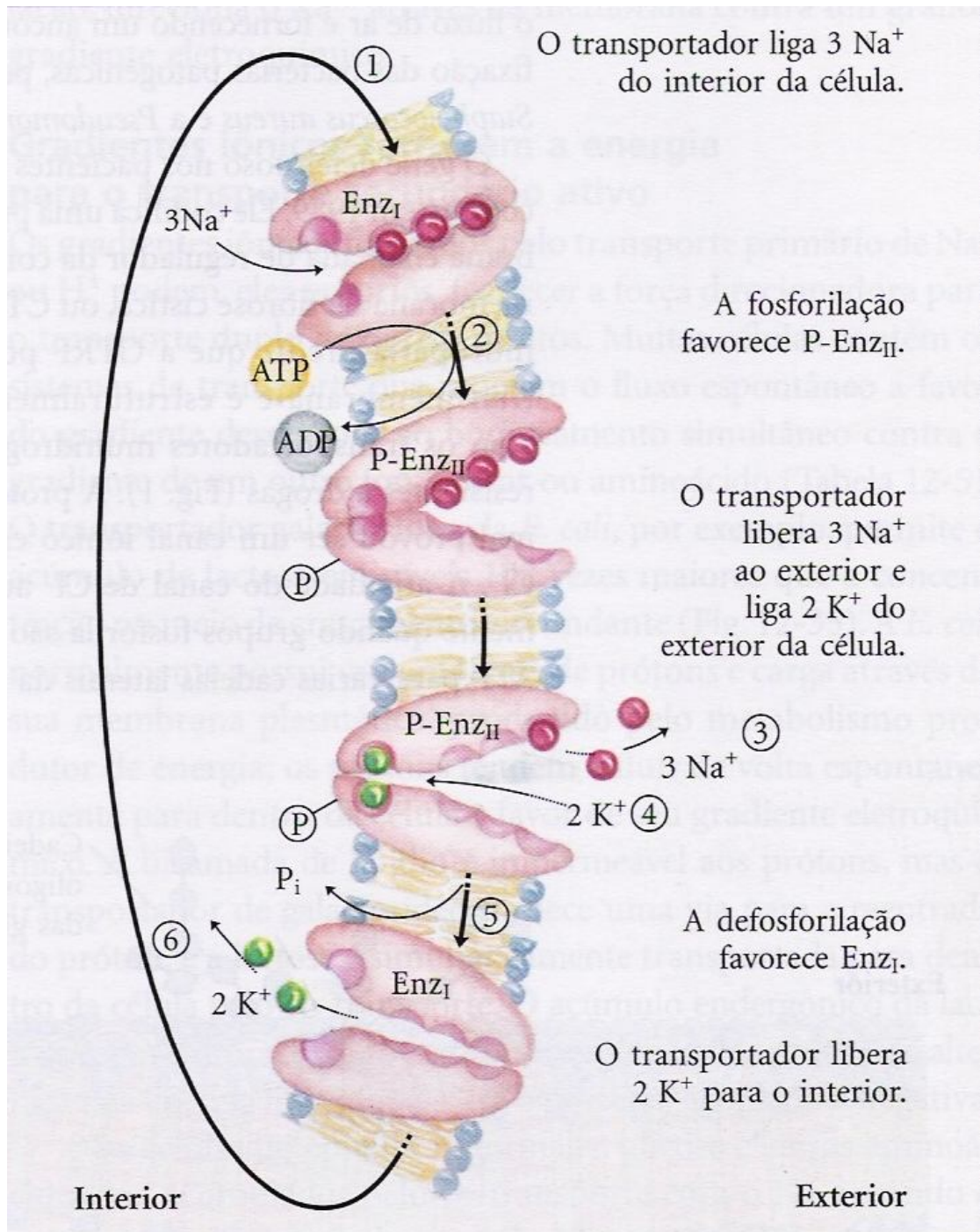


Figura 4 – Fases da troca de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>

### 3.3.2 Características funcionais da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

De acordo com Skou (1988), as funções fisiológicas da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase são de manutenção do controle do gradiente de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, gerando o

potencial de repouso, manutenção de altas concentrações de  $K^+$  intracelular, responsáveis por reações celulares como a glicólise, regulação osmótica e transporte ativo de outras substâncias como açúcares, aminoácidos, íons cloro e contenção do transporte de íons cálcio e prótons hidrogênio.

A  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase possui dois estados conformacionais: E1 e E2, que caracterizam as enzimas do tipo P e, segundo a reação de Albert - Post, em um deles se dá a hidrólise do ATP (CHOW e FORTE, 1995; HORISBERG et al., 1991). Segundo Jorgensen (2003), os mecanismos de transporte iônico se dão pela ligação de três íons  $Na^+$  em sítios de ligação com alta afinidade para este íon na porção citoplasmática da enzima e com fosforilação dependente de  $Na^+$  e oclusão dos íons ligados. Com isso, acontece uma transição conformacional (E1 para E2) e transporte dos íons  $Na^+$  para a região extracelular. Logo após esta transição, a enzima perde a afinidade com o  $Na^+$  e acontece uma ligação de dois íons  $K^+$  em sítios de alta afinidade para este íon, agora orientados para a região extracelular. Com a desfosforilação ativada por  $K^+$  e oclusão destes íons ocorre outra transição conformacional (E2 para E1) e transporte dos íons  $K^+$  para a região intracelular.

O estado de fosforilação da enzima  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase, pode ser regulado por substâncias endógenas como a ouabaína, neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e norepinefrina (estimulador) e hormônios como a insulina, além do ATP, (YU, 2003), além de agentes que ativam a proteína quinase G, como o GMPc e NO. Por outro lado, há evidência que a proteína Quinase C (PKC) ative a  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase via ativação de receptores glutamatérgicos (NATHANSON et al., 1995).

### 3.3.3 $Na^+$ , $K^+$ -ATPase e doenças do sistema nervoso central

Da mesma forma que a enzima  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase é responsável pelo potencial de repouso da membrana, propagação do impulso nervoso e outras atividades importantes, uma falha em seu funcionamento pode ocasionar um aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal (GRISAR, 1984). Segundo Harmony (1968), danos na permeabilidade da membrana neuronal por falha no funcionamento do sistema de transporte de cátions através da mesma, podem causar oscilações no potencial de membrana com despolarizações prolongadas ou disparos neuronais

repetitivos, características exibidas por neurônios de indivíduos epiléticos. Neste contexto, alguns pesquisadores reportaram um decréscimo da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em hipocampos de ratos lesionados com cainato (ANDERSON et al. 1994) e em células gliais de pacientes com epilepsia do lobo temporal (GRISAR et al., 1984). De fato, diversos estudos têm sugerido que a propagação de ondas de despolarização (GRISAR et al., 1984) em córtex epilético pode ser consequência de uma falha na remoção do  $\text{K}^+$  do espaço extracelular devido a uma diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (FISHER et al., 1976). Cabe salientar que a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase também é relevante não só para o estudo da epilepsia, mas também para outras patologias, onde mecanismos moleculares como níveis elevados de prostaglandinas  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) e o acúmulo de proteína beta-amilóide estão envolvidos na diminuição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase na doença de Alzheimer (HATORI et al., 1998; TOWNSEND e PRATICO, 2005; DICKEY et al., 2005). Contudo, uma falência neuronal via deficiência de ATP, bem como a geração de ERO pode também acarretar em uma inibição da síntese protéica e consequente diminuição da atividade da enzima (SANDERS et al., 1970). Estudos com modelos experimentais de Alzheimer têm evidenciado uma diminuição de 30% na expressão da subunidade catalítica  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo. Além disso, células alveolares submetidas a situações de hipoxia apresentam uma diminuição na quantidade de subunidade catalítica bem como na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase através de processos endocitóticos desencadeados por ERO (DADA et al., 2003).

### 3.4 Memória

A capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente é chamada de memória (LENT, 2004). “Eu sou quem sou, cada um é quem é, porque todos lembramo-nos de coisas que nos são próprias e exclusivas, e não pertence a mais ninguém” (IZQUIERDO, 2002). As nossas memórias fazem com que cada ser humano ou animal seja um ser único, um indivíduo. “...somos aquilo que recordamos, literalmente. Não podemos fazer aquilo

que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconheçamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória...” (IZQUIERDO, 2002).

A memória mantém tudo aquilo que se aprende ou se experimenta durante a vida, pois não se nasce com as informações no cérebro, elas são adquiridas e acumuladas na mente: nomes, rostos, lugares, informações (LENT, 2004; SQUIRE e KANDEL, 2003)

Desta maneira, conforme o filósofo grego Aristóteles (384 – 322 a.C.) “todo homem, por natureza, quer saber”, temos a curiosidade de descobrir como a memória se forma, e se mantém, em uma oportunidade única de prolongar a individualidade humana. Já Abel e Lattal (2001) descrevem três fases para a memória: a “aquisição” ou aprendizagem, a “consolidação”, onde armazena-se a informação e a fase de “evocação”, quando recorda-se o que foi armazenado.

### 3.4.1 Tipos de memórias

De acordo com Bear et al (2006), a aquisição de novas informações ou novos conhecimentos é chamada aprendizado e a retenção desta informação aprendida chama-se memória. Muitas pesquisas são feitas sobre memória e aprendizado e, uma classificação dos tipos de memória pode ser feita quanto ao conteúdo e o tempo de duração.

Quanto ao seu conteúdo, a memória pode ser “declarativa”, que é aquela sobre fatos e eventos, que consegue-se verbalizar e estão disponíveis para evocação consciente. São fáceis de formar, mas também fáceis de esquecer e requerem o lobo temporal e o hipocampo; ou como “não-declarativa” (também chamada de “memória implícita”), pois resulta da experiência (habilidades, hábitos e comportamentos) e envolve a amígdala, gânglios da base e cerebelo. Prática e repetição são necessárias para a sua formação e, por isso, há uma menor probabilidade de ser perdida (ALBRIGHT et al., 2000; LEES e JONES, 2000).

A memória declarativa é classificada quanto ao seu tempo de duração:

\* “Memória imediata”, também chamada de “memória de trabalho”, para uso em curto espaço de tempo. Não forma “arquivos” e depende da atividade elétrica do córtex pré-frontal.



\* Memória de curta duração (ou “curto prazo”) aquela que dura apenas minutos a poucas horas, mas é muito sensível a perturbações e pode ser eliminada por traumatismo craniano ou processo convulsivo, os quais não afetam as memórias de longa duração. Formam “traços” de memória.

\* “Memória de longa duração” é aquela que pode ser evocada após dias, meses ou anos da armazenagem e também forma “traços” de memórias, ou seja, persiste por muito tempo.

As memórias de curta e longa duração requerem as mesmas estruturas nervosas, mas envolvem mecanismos diferentes (IZQUIERDO et al., 1998). Neste contexto, o chamado “traço de memória” é aquele período em que ocorre a consolidação da informação, que corresponde a algumas horas após o aprendizado na memória de longa duração, onde a memória é sensível a vários tratamentos, como fármacos ou drogas de abuso, ou mesmo traumatismo craniano (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE e KANDEL, 2003).

#### 3.4.2 Formação da memória

Com relação ao tipo de memória, evidências mostram que existem diferentes processos bioquímicos envolvidos na formação da memória de um fato (aprendizado) e a evocação (lembança) (ABEL e LATTAL, 2001; IZQUIERDO, 2002). Além disso, a expressão gênica, síntese protéica e ativação de várias vias metabólicas estão relacionadas com a formação da memória de longa duração – não existe expressão gênica nem síntese protéica na formação da memória de curta duração (ABEL e KANDEL, 1998; MAYFORD e KANDEL, 1999; ALBRIGHT et al., 2000; CAMMAROTA et al., 2000; KANDEL, 2001; IZQUIERDO, 2004). O aumento desta síntese é consequência de outras alterações cerebrais, fazendo parte das muitas modificações observadas durante o processo de formação da memória. Porém, anterior à síntese proteica, ocorrem alterações na liberação de neurotransmissores e na comunicação entre neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas (McGAUGH, 2000; McGAUGH e IZQUIERDO, 2000). O glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos na formação da memória, que se liga a receptores específicos (NMDA, AMPA, Cainato e

glutamatérgicos metabotrópicos), localizados no neurônio alvo (o que recebe a informação). Na ligação com estes receptores, acontecem alterações neuronais ativando canais iônicos e mecanismos intracelulares, através de enzimas, que resultam na síntese de proteínas e aumentando a efetividade da transmissão de informações, que chamamos de plasticidade sináptica, que parece ser o mecanismo pelo qual se aprende e se lembra (ABEL e LATTAL, 2001; CAHILL e McGAUGH, 1998; DALMAZ e NETTO, 2004; McGAUGH, 2000; McGAUGH, 2002).

### 3.4.3 Hipocampo

Uma das estruturas envolvidas na aquisição, consolidação e evocação da memória é o hipocampo, situado medialmente ao ventrículo lateral. Abaixo do dele, se localizam três regiões importantes, o córtex entorrinal, o córtex perirrinal e o córtex para-hipocampo. No hipocampo existem estruturas importantes para o processo de aprendizagem, como os campos CA1 a CA3, no corno de Amon e o giro denteado (BEAR et al., 2002).

As informações acessam no hipocampo através do córtex entorrinal, que envia essas informações ao hipocampo pela “via perforante” (feixe de axônios) que estabelece sinapses com neurônios do giro denteado (PAXINOS e WATSON, 1986). Os axônios destes neurônios são chamados de fibras musgosas e estabelecem sinapses em células CA3. Estas se ramificam e o ramo colateral de Schaffer forma sinapses excitatórias em neurônios da CA1 (LORENTE de NÓ, 1934) e transmitida a partir desta, em conjunto com outras áreas formando uma saída de informação pré-processada no hipocampo (PAXINOS e WATSON, 1986). Em conjunto com suas conexões, o hipocampo parece ser de grande importância para a aquisição, consolidação e evocação da memória (BERNABEN et al., 1996; CHOU e LEE, 1995; IZQUIERDO e MEDINA, 1995; MORRIS, 1989; RUBIN et al., 2000).

### 3.4.4 Memória espacial

A habilidade para armazenar, codificar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas é característica da memória espacial que permite lembrar a localização de objetos ou encontrar o caminho dentro do meio ambiente (KESSELS et al., 2001). Neste contexto, estudos com roedores (EICHENBAUM, 2002) e com primatas (BRASTED et al., 2003) revelam que o hipocampo exerce um papel importante na memória espacial.

Existem três teorias que tentam explicar a formação de uma representação mental da memória espacial, as quais consideram a noção de um sistema com componentes múltiplos.

#### 3.4.4.1 Teoria do mapeamento cognitivo

De acordo com Burgess et al. (2002), o hipocampo possui a capacidade de codificar relações espaciais na forma de um mapa cognitivo aloentríco (centrado no mundo) significando uma representação formada com base em informações sobre a localização absoluta em nosso ambiente (distância e direção) independente do observador.

#### 3.4.4.2 Teoria da memória operacional

De uma maneira diferente, a teoria de Olton (1979) considera que o hipocampo não é especializado na memória espacial, mas em um processo que consiste em manter e manipular informações ao presente momento ou contexto (ABRAHAMS et al., 1997) e que o déficit de memória ocorreria porque a localização espacial seria codificada como um evento ou contexto.

#### 3.4.4.3 Teoria das estratégias de ligação

De acordo com Eichenbaum (2002), o hipocampo direito forma estratégias de ligação, captando características individuais diferentes da informação em nosso ambiente. As distintas características de uma cena ou de um objeto seriam processadas por meio de vias diferentes do cérebro, mas conectadas quando necessário. O autor também sugere que o hipocampo relaciona memórias que apresentam duas características principais: a capacidade de comparar e contrastar informações e capacidade de fazer uso inferente da memória em novas situações. Ainda segundo o pesquisador, além de estar associado à memória, o hipocampo também estaria ligado à capacidade de conectar informações.

### 3.5 Exercício físico

A sobrevivência de muitos animais é, garantida pelo exercício, o qual é responsável pelo desenvolvimento de qualidades físicas necessárias para isso. À exceção dos demais animais, os seres humanos não usam o exercício como meio de sobrevivência, mas como um estilo de vida, recreação e, também, como tratamento terapêutico (JI, 1999). Neste contexto, estudos recentes relatam efeitos positivos resultantes da prática de atividade física sobre o sistema nervoso, tanto em humanos como em modelos animais (RADAK et al., 2008). Dentre estes efeitos figuram o aumento da sobrevivência neuronal e a resistência cerebral induzidas por diferentes insultos (BOVERIS & NAVARRO, 2008). Outra linha de pesquisa que tem despertado interesse da comunidade científica envolve o papel do exercício físico sobre os aspectos psicobiológicos, onde estudos relatam uma forte correlação entre o aumento da capacidade aeróbica e melhoria nas funções cognitivas (KRAMER et al., 1999; LAURIM et al., 2001). Algumas hipóteses justificam este fato pelas alterações hormonais, liberação de neurotransmissores e ativação de receptores específicos em resposta ao exercício físico (GÓMEZ-PINILLA et al., 2008).

Entretanto, da mesma forma que o exercício físico oferece benefícios para a saúde, é também responsável pelo aumento no consumo de oxigênio e,

consequentemente a geração de EROs (BOVERIS & NAVARRO, 2008). Apesar disso, o aumento da síntese de enzimas antioxidantes como SOD (HIGUCHI et al., 1985; LEEUWENBURGH et al., 1997), CAT (QUINTANILHA, 1984; OH-ISHI et al., 1997) e GPX (JI et al., 1995; JI et al., 1998) induzidos pelo treinamento físico constitui-se em uma adaptação metabólica capaz de proteger as células e tecidos do estresse oxidativo gerado pelo próprio exercício físico (BANERJEE, 2003).

### 3.5.1 Exercício físico, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem ser geradas durante o exercício, em paralelo com o aumento do consumo de oxigênio, por meio de diversas fontes que podem ser mais importantes do que outras em certos órgãos e em períodos ou exercícios específicos (JI, 1996; JI, 1999). Estudos demonstram que o dano oxidativo no cérebro está ligado à diminuição das funções cerebrais (RADAK et al., 2001). Em ratos normais, a lipoperoxidação no cérebro ocorre somente com a suplementação de vitamina C, sugerindo que a oxidação de lipídios no Sistema Nervoso Central (SNC) pode ocorrer em diferentes regiões do cérebro, bem como ser resultado de um aumento regional no consumo de oxigênio (COSKUN et al., 2005). Além disso, têm evidenciado que o exercício físico extenuante pode manifestar um desbalanço entre EROs e as defesas antioxidantes, resultando em um ambiente com excesso de radicais livres no corpo (MEYDANI e EVANS, 1993; JENKINS, 1988; SJODIN et al., 1990; JI, 1995; SEN, 1995). Estudos “in vivo” utilizando tecidos coletados logo após o exercício demonstram que a taxa de produção de EROs aumenta significativamente após o exercício exaustivo em ratos jovens e adultos (BEJMA e Ji, 1999). Desta forma, a produção de EROs não só se eleva como resultado do consumo de oxigênio, mas pode contribuir para a fadiga de baixa frequência (REID et al., 1994) onde a produção de radicais livres pode ser proporcional ao desenvolvimento de tensão muscular (O’NEIL et al., 1996).

Por outro lado, o sistema antioxidante, o qual constitui a defesa contra os radicais livres gerados no organismo, também pode ser afetado pelo exercício físico (CLARKSON, 1995). Além disso, uma série aguda de exercícios pode aumentar a atividade de algumas enzimas antioxidantes sem a necessidade de nova síntese

protéica. Esta atividade de proteção é limitada a características enzimáticas individuais e o tecido envolvido. Já como estratégia em longo prazo, as células podem aumentar a síntese protéica de enzimas antioxidantes para controlar o estresse oxidativo (RADAK et al., 2008). O acréscimo da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro como resposta ao exercício físico regular está provavelmente ligado ao excesso de formação de radicais livres (RADAK, et al., 1995a; RADAK, et al., 1995b; SOMANI, et al., 1995), um dos possíveis fatores associados à regulação da função cerebral (CARNEY, 2000; RADAK, et al., 1995a; RADAK, et al., 1995b; SOMANI, et al., 1995; ). Um exemplo disto é a atividade da enzima SOD que se eleva no tronco cerebral e estriado de ratos após treinamento de corrida em esteira, acompanhada de acréscimo na concentração de glutathiona no córtex e tronco cerebral (OGONOVSKY, et al., 2005).

Além de a atividade física acarretar uma série de benefícios tanto na esfera física quanto mental das pessoas, ela também tem sido considerada uma ferramenta terapêutica contra o TCE (VITALE et al., 1996; GREALY et al., 1999; BOOTH et al., 2002). Apesar de não existir um tratamento totalmente eficaz no combate aos problemas neurológicos decorrentes do trauma (GRIESBACH et al, 2004), estudos com animais têm evidenciado que o exercício físico tem forte ligação à proteção neuronal, é capaz de aumento da neurogênese (van PRAAG et al., 1999) e melhoria na memória (FORDYCE & WEHNER, 1993; SAMORAJSKI et al., 1985; van PRAAG et al., 1999).

### 3.5.2 Exercício físico e cognição

A atividade física tem sido associada com a redução do número doenças cardiovasculares, câncer de cólon e de seio e obesidade e das doenças mentais (como depressão e ansiedade) (HSS, 2000).

A investigação científica sobre a relação entre o exercício físico e a cognição teve início na década de 1930 e, nas décadas posteriores, foram observadas evidências sobre a relação entre a condição física e o tempo de reação a estímulos (BURPEE e STROLL, 1936; LAWATHER, 1951; PIERSON e MONTOYE, 1958). Pesquisas com animais mostram que o ambiente enriquecido, incluindo acesso a

equipamentos de exercício físico, gera resultados positivos no aprendizado e memória (VAYNMAN e GÓMEZ PINILLA, 2006) e que uma semana de exercício voluntário pode aumentar a capacidade de aprendizado e memória de ratos (VAYNMAN et al., 2004). Utilizando-se de técnicas de neuroimagem como Potencial Evocado Relacionado a Eventos (ERP) e Ressonância Magnética, tem sido observada uma ligação entre o exercício e a cognição em humanos onde o exercício físico pode levar a mudanças na estrutura e no funcionamento de regiões específicas do cérebro, como hipocampo e córtex cerebral (BOOTH e LEES, 2006).

Nos últimos anos têm-se evidenciado os efeitos benéficos do exercício físico regular nas funções cerebrais, com papel preventivo e terapêutico importante na prevenção de doenças neurodegenerativas (STUMMER et al., 1995; MATSON, 2005; MATSON & WAN, 2005; MATSON & MAGNUS, 2006) como a Doença de Parkinson (SMITH & ZIGMOND, 2003; CANNING et al., 2009; POTHAKOS et al., 2009) e a Doença de Alzheimer (COTMAN & BERCHTOLD, 2002; PÉREZ & CANCELA CARREL, 2008). Segundo McAuley e Rudolph (1995), o exercício contribui para a integridade cerebrovascular, o aumento no transporte de oxigênio para o cérebro, a síntese e a degradação de neurotransmissores, bem como a diminuição da pressão arterial, dos níveis de colesterol e triglicérides, a inibição da agregação plaquetária, o aumento da capacidade funcional e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade de vida. Além disso, diversos estudos têm sugerido que alterações hormonais (catecolaminas, ACTH e vasopressina); bem como a liberação de  $\beta$ -endorfina (BORTS et al., 1981) e ativação de receptores serotoninérgicos (STRÜDER & WEINECKR, 2001,a,b) estão envolvidos no incremento da função cognitiva induzida exercício físico.





## **4. CAPÍTULOS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados neste item, o qual se apresenta dividido sob forma de artigos científicos (capítulos I e II). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Bibliografia, encontram-se nos mesmos.

**4.1 Capítulo I - O papel da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no déficit cognitivo e no dano oxidativo após traumatismo crânio encefálico experimental.**

Artigo

**Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ACTIVITY IMPAIRMENT AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY: RELATIONSHIP TO SPATIAL LEARNING DÉFICITS AND OXIDATIVE STRESS**

Frederico Diniz Lima, Mauren Assis de Souza, Ana Flávia Furian, Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Felipe Villa Martignoni, Mauricio Scoppel Hoffmann, Michele Rechia Figuera, Luiz Fernando Freire Royes, Mauro Schneider Oliveira, Carlos Fernando de Mello.

Behavioural Brain Reseach, 193 (2008), 306 – 310



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

Short communication

## Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: Relationship to spatial learning deficits and oxidative stress

Frederico Diniz Lima<sup>a</sup>, Mauren Assis Souza<sup>a</sup>, Ana Flávia Furian<sup>a,b</sup>, Leonardo Magno Rambo<sup>c</sup>, Leandro Rodrigo Ribeiro<sup>c</sup>, Felipe Villa Martignoni<sup>a</sup>, Maurício Scopel Hoffmann<sup>a</sup>, Michele Rechia Figuera<sup>d</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>c</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>a,b,\*</sup>, Carlos Fernando de Mello<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatría, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 March 2008

Received in revised form 13 May 2008

Accepted 15 May 2008

Available online 23 May 2008

## Keywords:

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Protein carbonylation

TBARS

Barnes maze

FPI

## ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a devastating disease that commonly causes persistent mental disturbances and cognitive deficits. Although studies indicate that oxidative stress and functional deficits occurring after TBI are interrelated events, the knowledge of the mechanisms underlying the development of such cognitive deficits has been limited. Thus, in the present study, we investigated the effect of fluid percussion brain injury (FPI) on a spatial learning task and levels of oxidative stress markers, namely, protein carbonylation and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity 1 or 3 months after FPI in rats. Statistical analysis revealed that FPI increased the scape latency and mean number of error in Barnes maze test 1 and 3 months after FPI. We also found that protein carbonylation and TBARS content increased in the parietal cortex 1 and 3 months after FPI. In addition, 3 months after FPI, protein carbonylation levels increased both in ipsilateral and contralateral cortices of FPI animals. Indeed, statistical analysis revealed a decrease in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the cerebral cortex of 1 month FPI animals. Furthermore, the decrease in enzyme activity found 3 months was larger, when compared with 1 month after FPI. These results suggest that cognitive impairment following TBI may result, at least in part, from increase of two oxidative stress markers, protein carbonylation and TBARS that occurs concomitantly to a decrease in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Traumatic brain injury (TBI) is one of the major events in civilian life [3] and is a leading cause of disability and death [13]. The patients who survive present severe long-term neurological abnormalities, including deficits in learning and memory [26]. Functional deficits result from both direct, immediate mechanical disruption of brain tissue (the primary injury) and indirect, delayed (secondary) injury mechanisms. Secondary mechanisms are potentially amenable to post-injury therapeutic intervention because of their delayed onset and progression over hours to days and months after the initial trauma and include intracranial hemorrhage, brain swelling, raised intracranial pressure, and hypoxic/ischemic brain

damage, among others [17]. The oxidative damage mediated by reactive oxygen (ROS) and nitrogen species is a significant component of the secondary injury cascade that accompanies TBI [24]. In fact, increased levels of markers of oxidative stress have been found in human cerebrospinal fluid after severe TBI [2,31] and also in animal models of TBI, such as in the fluid percussion and controlled cortical impact models of TBI [23,32]. It is also remarkable that pharmacological treatment with antioxidants can significantly ameliorate motor and cognitive outcomes after TBI. For instance, the antioxidant  $\alpha$ -phenyl-*N*-*tert*-butyl nitron markedly improve neurological reflexes and the performance in Morris water maze test as well as significantly reduced the loss of ipsilateral hemispheric tissue [15]. The results of these studies seem to indicate that oxidative stress and functional deficits occurring after TBI are interrelated events and that the study of the mechanisms involved in this interface can open new avenues to better understand the TBI pathology [5]. Thus, since Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

\* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3220 9378; fax: +55 51 3220 8241.  
E-mail address: [oliveira.ms@gmail.com](mailto:oliveira.ms@gmail.com) (M.S. Oliveira).

is especially sensitive to oxidative stress [12,18] and is a key enzyme involved in maintenance of brain excitability and its inhibition induces spatial learning deficits [35], we investigated the role of this enzyme in spatial learning deficits induced by experimental TBI. For this purpose, spatial learning performance, levels of oxidative stress markers, namely, protein carbonylation and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase activity were measured 1 or 3 months after a single episode of fluid percussion in the rat.

Adult male Wistar rats (270–300 g), maintained under controlled light and environment (12:12 h light/dark cycle,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 55% relative humidity), with standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) and water *ad libitum*. All reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) except TBA, which was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All experimental protocols designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. Animal utilization reported in this study has been conducted in accordance with the policies of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996, and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (23081.018516/2006-57).

Fluid percussion brain injury (FPI) was carried out as described previously by D'Ambrosio et al. [6,7]. Animals were anesthetized with a single i.p. injection of Equithesin (6 ml/kg), a mixture containing sodium pentobarbital (58 mg/kg), chloral hydrate (60 mg/kg), magnesium sulfate (127.2 mg/kg), propylene glycol (42.8%), and absolute ethanol (11.6%) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. A burr hole of 3 mm in diameter was drilled on the right convexity parietal cortex, 2 mm posterior to the bregma and 3 mm lateral to the midline, taking care to keep the dura mater intact. A plastic injury cap was placed over the craniotomy with dental cement. When the dental cement hardened, the cap was filled with chloramphenicol and the animal was removed from the stereotaxic device and returned to its homecage. After 24 h, the animals were anesthetized with halothane, and had the injury cap attached to the fluid percussion device and placed in a heat pad maintained at  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

Traumatic brain injury was induced by a fluid percussion device developed in our laboratory. A brief (10–15 ms) transient pressure fluid pulse ( $3.53 \pm 0.17$  atm) impact was applied against the exposed dura to model severe TBI. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (Fluid Control Automação Hidráulica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Gould Ltd., Essex, UK). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of the FPI. Immediately after these procedures, the cap was removed and the orifice was covered with dental cement.

The tests for spatial learning assessment as well as neurochemical determinations (oxidative stress parameters and  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase activity) were performed at 1 or 3 months after the FPI. For this purpose, sham and FPI animals were randomly assigned in four groups, as follows:

- Experiment 1 (performed at 1 month after FPI): sham ( $n=8$ ) and FPI ( $n=8-9$ ).
- Experiment 2 (performed at 3 months after FPI): sham ( $n=8$ ) and FPI ( $n=8-9$ ).

To test the performance of the animals in a spatial learning paradigm, we choose the Barnes maze test, described by Barnes [1] and adapted by Oliveira et al. [22]. The apparatus was located in a  $4\text{ m} \times 4\text{ m}$  test room where four visuospatial cues made of rigid

black paper (rectangle, circle, cross, triangle) were affixed to the walls but not directly over any one maze hole.

Briefly, on the first day of experiment, the rats were moved to the testing room and left undisturbed for 60 min. Following this habituation period, the rats were trained to find the escape hole; they were placed in the escape box for 1 min, then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the maze. With light on, the start box was removed and the rat allowed exploring freely and finding the escape box. A maximum latency of 180 s to find it was allowed. Each rat was given three trials per day, over four consecutive days. In each trial we scored the time to reach the escape tunnel and the number of wrong holes visited. The arena, as well boxes, was wiped clean using distilled water both between each training session for a given rat and between each rat. Immediately after the Barnes maze test, the animals were transferred to the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. The number of areas crossed was recorded for 20 min.

After the behavioral evaluation, the animals were killed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. The ipsilateral cortex was rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish. The contralateral cortex was subjected to the same procedure and served as internal control. Each tissue sample was homogenized in cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and then divided in aliquots for subsequent neurochemical analyses, as described below.

TBARS content was estimated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% SDS, 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was finally made up to 2 ml with type I ultrapure water and heated at  $95^\circ\text{C}$  for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm [21]. Total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. [34], adapted for brain tissue [27]. Assay of  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase activity was performed according Wyse et al. [33]. Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford [4], using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard. Statistical analysis was carried out by the Kruskal-Wallis test. Post hoc analysis was carried out, when appropriate, by the followed by Mann-Whitney test. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient.

Fig. 1A and B shows the effect of FPI on the rat performance in the Barnes maze test. The first set of experiments was performed 1 month after FPI, and FPI animals showed an increased latency for escape at the second day of test, and number of errors at the second and third days of test when compared with sham animals, indicating a decreased performance of FPI animals in this spatial learning paradigm. There were no significant differences between sham and FPI animals in the latency for escape and number of errors in the first and in the fourth days of test. A decreased performance of FPI animals in the Barnes maze test was also found at 3 months after FPI, since FPI animals showed an increased latency for escape at the second and third days of test, and an increased number of errors at the third day of test, when compared with sham animals. We did not detect any motor deficit in the animals by analyzing the number of crossings in the open field, suggesting that a impaired performance in the Barnes maze is not related to motor disabilities.

In order to evaluate the association between spatial learning deficits and levels of oxidative stress markers 1 or 3 months after FPI, we measured the levels of reactive species-induced damage to lipids (TBARS) and proteins (protein carbonylation). TBARS content increased in parietal cortex of FPI animals at 1 and 3 months, both in the ipsilateral and contralateral sides. Protein carbonylation levels are shown in Fig. 2B. One month after FPI, protein carbonylation

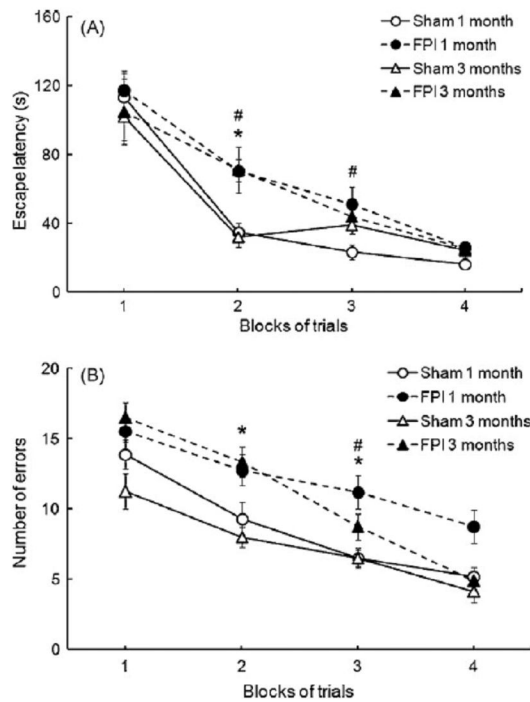


Fig. 1. Effect of fluid percussion brain injury (TBI) on the (A) escape latency and (B) number of errors in the Barnes maze test. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 8-9$  animals in each group. \* $P < 0.05$  compared with 1 month sham group. # $P < 0.05$  compared with 3 months sham group.

levels increased only in the ipsilateral cortex of FPI animals, in comparison with sham animals. However, 3 months after FPI, protein carbonylation levels increased both in ipsilateral and contralateral cortices of FPI animals, when compared with sham animals. Such increase in protein carbonylation levels in FPI animals was larger at 3 months than at 1 month after FPI, indicating that protein carbonylation increases over time after FPI, both in ipsilateral and contralateral cortices.

Since  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is especially sensitive to oxidative stress, we evaluated the effect of FPI on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (Fig. 2C). Statistical analyses revealed a decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the ipsilateral cerebral cortex of FPI animals both at 1 and 3 months after FPI, when compared with sham animals. Furthermore, the decrease in enzyme activity 3 months after FPI was larger, when compared with decrease at 1 month after FPI, indicating that FPI-induced decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is time-dependent.

Considering that a decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity plays role in learning and memory deficits [35], we decided to investigate whether  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the ipsilateral cerebral cortex correlated with animal performance (escape latency) in the Barnes maze at the second day of test (in which the learning deficits were more evident). Statistical analysis demonstrated that there is no correlation between these parameters, either in sham (Pearson's coefficient = 0.267;  $P > 0.05$  for  $n = 17$ ) or FPI (Pearson's coefficient = 0.089;  $P > 0.05$  for  $n = 17$ ) animals (data not shown).

In this study we showed that a single FPI episode in rat parietal cortex decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity with a concomitant increase in levels of oxidative stress markers, protein carbonylation and TBARS. Moreover, animals showed an impaired ability to

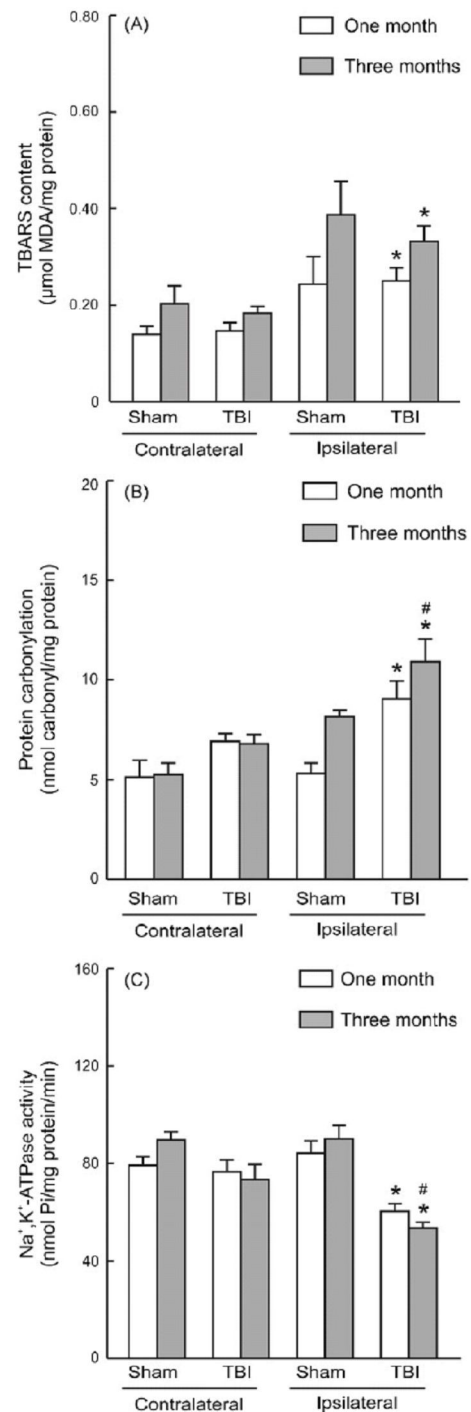


Fig. 2. Effect of fluid percussion brain injury (TBI) on (A) TBARS content, (B) protein carbonylation levels and (C)  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in rat parietal cortex. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 8-9$  animals in each group. \* $P < 0.05$  compared with respective sham group. # $P < 0.05$  compared with 1 month after TBI group.

perform the Barnes maze, a spatial learning task. These alterations were found both at 1 or 3 months after FPI.

Chronic cognitive impairments such as deficits in attention, slow processing speed, or learning and memory are frequently reported as a consequence of TBI in humans [26] and experimental animals [5]. Although the cognitive impairments are among the most debilitating outcomes in patients, yet, to date, no treatment can prevent or counteract these effects in TBI patients [14,20,30]. Moreover, the mechanisms underlying the development of such cognitive deficits remain elusive. While neuronal death has been considered to be a major factor, the pervasive memory, cognitive and motor function deficits suffered by many mild TBI patients do not always correlate with cell loss. In this context, it has been demonstrated that pharmacological treatment with neurotrophin-4/5 significantly protects against hippocampal cell death in mice, but not improves animal performance in three hippocampal-dependent behavioral tests [25] suggesting that cognitive impairment following TBI may result, at least in part, from alterations in surviving neurons [5].

In this study we showed that FPI induces a decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. These results are in full agreement with the view that FPI-induced neurochemical alteration, such  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity inhibition, might be a factor contributing to a decreased rat performance in the Barnes maze task. Accordingly, the intracerebroventricular injection of ouabain, a selective inhibitor of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase impairs rat performance in the Morris water maze, another spatial learning and memory test [35]. Moreover, transgenic mice lacking the  $\alpha$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase have severe learning and memory deficits, as determined using the Morris water maze [19]. Altogether, these data may suggest that the presently reported deficits in spatial learning and decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity after TBI are interrelated events, and one might suggest that decreased  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity may contribute to the currently observed deficits in spatial learning after TBI. However, one may consider the fact that  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in the ipsilateral cerebral cortex did not correlate with animal performance in the Barnes maze at the second day of test, suggesting that other factors may also contribute to impaired spatial learning performance after TBI.

The mechanisms underlying the presently observed decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity may include oxidative modification, since in the present study we showed that increase in protein carbonylation and TBARS occurs concomitantly to a decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. In concordance with this view, it has been demonstrated that oxidative damage, mediated by reactive oxygen and nitrogen species, including the superoxide ion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, nitric oxide, and peroxynitrite, is well recognized as a significant component of the secondary injury cascade that accompanies TBI [24]. Furthermore, while free-radical-induced damage has been proposed to be involved in traumatic cell injury and cell death, free radical scavengers, such catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px) are associated with partial amelioration of traumatic injury [11,16,29].

Nevertheless, whether the presently reported increase in protein carbonylation and TBARS levels reflects a decrease in antioxidant defenses, an increase in reactive species formation or both remains to be determined, but it is interesting to point out that the increase in these markers of oxidative stress occur in parallel with a decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. It has long been known that the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity is particularly sensitive to reactive species, which alter plasma membrane lipid composition [12] and the redox state of regulatory sulfhydryl groups [18] as well as other amino acid residues [28]. In addition, oxidative and nitrosative stress induce protein carbonylation [9], which is related to increased susceptibility to proteolysis and marked impairment of protein functionality [8]. Moreover, Dobrota et al. [10] suggested

that the most important consequence of oxidative modification is that  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase molecules have lost the ability to interact with one another, decreasing oligomeric structure formation and leading to subsequent hydrolysis rate suppression.

In summary, the present study we showed that a single episode of FPI induces impairment in animal performance in a spatial learning and memory paradigm, an increase of the oxidative stress markers and a decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. Furthermore, these findings add a new insight into the neurochemical mechanism involved in the TBI-induced spatial learning impairment. Therefore, while the exact mechanism underlying of secondary injury after TBI is poorly understood, we think that these data may help in the understanding of TBI pathology.

#### Acknowledgements

Research supported by CNPq (grants 505527/2004-9 and 301552/2007-0) and CAPES. Mauro Schneider Oliveira is the recipient of CAPES fellowship. Carlos Fernando de Mello and Ana Flávia Furian are the recipients of CNPq fellowships.

#### References

- [1] Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979;93:74–104.
- [2] Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin V, Ruppel RA, Adelson PD, et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatr Res* 2002;51:571–8.
- [3] Beghi E. Overview of studies to prevent posttraumatic epilepsy. *Epilepsia* 2003;44(Suppl 10):21–6.
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [5] Cohen AS, Pfister BJ, Schwarzbach E, Grady MS, Goforth PB, Satin LS. Injury-induced alterations in CNS electrophysiology. *Prog Brain Res* 2007;161:143–69.
- [6] D'Ambrosio R, Fairbanks JP, Fender JS, Born DE, Doyle DL, Miller JW. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain* 2004;127:304–14.
- [7] D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D. Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci* 1999;19:8152–62.
- [8] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23–38.
- [9] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324(Pt 1):1–18.
- [10] Dobrota D, Matejovicova M, Kurella EG, Boldyrev AA.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:141–9.
- [11] Ikeda Y, Brelford KL, Ikeda K, Long DM. Oxygen-free radicals in traumatic brain oedema. *Neuro Res* 1989;11:213–6.
- [12] Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A. Modulation of mouse cerebral  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 1995;7:333–7.
- [13] Langlois JA, Kegler SR, Butler JA, Gotsch KE, Johnson RL, Reichard AA, et al. Traumatic brain injury-related hospital discharges. Results from a 14-state surveillance system, 1997. *MMWR Surveill Summ* 2003;52:1–20.
- [14] Maas AI. Neuroprotective agents in traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:753–67.
- [15] Marklund N, Clausen F, Lewen A, Hovda DA, Olsson Y, Hillered L. Alpha-phenyl- $\beta$ -N-butyl nitron (PBN) improves functional and morphological outcome after cortical contusion injury in the rat. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:73–81.
- [16] Marmarou CR, Walker SA, Davis CL, Povlishock JT. Quantitative analysis of the relationship between intra-axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22:1066–80.
- [17] Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* 2005;136:971–89.
- [18] Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 1998;33:531–40.
- [19] Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 2007;27:616–26.
- [20] Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegan A, Bracken MB, et al. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 2002;19:503–57.

- [21] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [22] Oliveira MS, Furian AF, Figuera MR, Fiorenza NG, Ferreira J, Rubin MA, et al. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. *Behav Brain Res* 2008;187:200–4.
- [23] Opii WO, Nukala VN, Sultana R, Pandya JD, Day KM, Merchant ML, et al. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24:772–89.
- [24] Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, et al. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 2006;3:143–53.
- [25] Royo NC, LeBold D, Magge SN, Chen I, Hauspurg A, Cohen AS, et al. Neurotrophin-mediated neuroprotection of hippocampal neurons following traumatic brain injury is not associated with acute recovery of hippocampal function. *Neuroscience* 2007;148:359–70.
- [26] Salmond CH, Sahakian BJ. Cognitive outcome in traumatic brain injury survivors. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:111–6.
- [27] Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Myskiw JC, Fiorenza NG, et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 2004;128:721–8.
- [28] Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ. 4-Hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med* 1996;20:215–23.
- [29] Soustiel JF, Glenn TC, Shik V, Boscardin J, Mahamid E, Zaaroor M. Monitoring of cerebral blood flow and metabolism in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22:955–65.
- [30] Tolias CM, Bullock MR. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? *NeuroRx* 2004;1:71–9.
- [31] Varma S, Janesko KL, Wisniewski SR, Bayir H, Adelson PD, Thomas NJ, et al. F2-isoprostane and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *J Neurotrauma* 2003;20:781–6.
- [32] Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exp Neurol* 2006;197:309–17.
- [33] Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M. Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 2000;11:2331–4.
- [34] Yan LJ, Traber MG, Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 1995;228:349–51.
- [35] Zhan H, Tada T, Nakazato F, Tanaka Y, Hongo K. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. *Neurol Res* 2004;26:35–40.

## 4.2 Capítulo II - Efeito profilático exercido pelo exercício físico no modelo de traumatismo crânio encefálico: uma análise bioquímica

Artigo

### **ADAPTATION TO OXIDATIVE CHALLENGE INDUCED BY CHRONIC PHYSICAL EXERCISE PREVENTS $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ACTIVITY INHIBITION AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY**

Frederico Diniz Lima, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Mauren Assis de Souza, Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Luiz Fernando de Almeida Silva, Leandro Thies Retamoso, Mauricio Scoppel Hoffmann, Danieli Valnes Magni, Letícia Pereira, Michele Rechia Fighera, Carlos Fernando de Mello, Luiz Fernando Freire Royes.

Brain Reseach, 1279 (2009), 147 – 155



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

## Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury

Frederico Diniz Lima<sup>a</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>a,b</sup>, Ana Flávia Furian<sup>a,b</sup>,  
Mauren Assis Souza<sup>a</sup>, Leonardo Magno Rambo<sup>a</sup>, Leandro Rodrigo Ribeiro<sup>a</sup>,  
Luiz Fernando Almeida Silva<sup>a,c</sup>, Leandro Thies Retamoso<sup>a,c</sup>, Maurício Scopel Hoffmann<sup>a</sup>,  
Danieli Valnes Magni<sup>d</sup>, Letícia Pereira<sup>a</sup>, Michele Rechia Figuera<sup>a,b,e</sup>,  
Carlos Fernando Mello<sup>a</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>a,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup>Centro de Ciências Naturais e Exatas, Laboratório de Neurotoxicidade, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup>Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 29 April 2009

Available online 5 May 2009

## Keywords:

Traumatic brain injury

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Oxidative damage

Physical exercise

## ABSTRACT

Physical exercise is likely to alter brain function and to afford neuroprotection in several neurological diseases. Although the favorable effects of physical exercise on traumatic brain injury (TBI) patients is well known, little information is available regarding the role of free radicals in the improvement induced by physical exercise in an experimental model of TBI induced by fluid percussion injury (FPI). Thus, we investigated whether 6 weeks of swimming training protects against oxidative damage (measured by protein carbonylation and thiobarbituric acid-reactive substances-TBARS) and neurochemical alterations represented by immunodetection of  $\alpha$  subunit and activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase after FPI in cerebral cortex of rats. Statistical analysis revealed that physical training protected against FPI-induced TBARS and protein carbonylation increase. In addition, physical training was effective against Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activity inhibition and  $\alpha_1$  subunit level decrease after FPI. Pearson's correlation analysis revealed that the decrease in levels of catalytic  $\alpha_1$  subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induced FPI correlated with TBARS and protein carbonylation content increase. Furthermore, the effective protection exerted by physical training against FPI-induced free radical correlated with the immunoccontent of the catalytic  $\alpha_1$  subunit maintenance. These data suggest that TBI-induced reactive oxygen species (ROS) generation decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by decreasing the total number of enzyme molecules, and

\* Corresponding author. Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: [nandoroyes@yahoo.com.br](mailto:nandoroyes@yahoo.com.br) (L.F.F. Royes).

that physical exercise protects against this effect. Therefore, the effective protection of selected targets, such as  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induced by physical training, supports the idea that physical training may exert prophylactic effects on neuronal cell dysfunction and damage associated with TBI.

Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Traumatic brain injury causes delayed neuronal dysfunction and death through secondary processes involving increased excitatory amino acids levels, loss of ionic equilibrium, decreased ATP production (Faden et al., 1989; Ross and Soltesz, 2000; Osteen et al., 2001; Sullivan et al., 2005) and increased free radical formation (Singh et al., 2006; Shao et al., 2006; Davis et al., 2008). Accordingly, increased levels of markers of oxidative stress have been found in human cerebrospinal fluid after TBI (Varma et al., 2003) as well as in controlled cortical impact models of TBI (Opii et al., 2007). Moreover, experimental findings from our group have showed that acute FPI-induced impairment in an animal spatial learning task increased oxidative stress markers and decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, suggesting that ROS-induced  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition may contribute to the deficits in spatial learning after TBI (Lima et al., 2008).

The ion pump  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is an ubiquitous plasma membrane protein which plays a key role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis in virtually all tissues. In the Central Nervous System (CNS),  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity accounts significantly for the maintenance of the electrochemical gradient across the plasma membrane underlying resting, action potentials as well as the modulation of neurotransmitter release and uptake. As a consequence, a decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as the whole animal behavior (Jamme et al., 1995; Li and Stys, 2001; Lees et al., 1990). Furthermore,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase seems to be particularly sensitive to free radical-induced damage because its inhibition has been associated with alterations in plasma membrane lipid composition (Dencher et al., 2007), in the redox state of regulatory sulphhydryl groups (Pari and Murugavel, 2007) and in other amino acid residues caused by free radicals or lipid peroxidation (Siems et al., 1996; Potts et al., 2006).

Maintaining brain health and plasticity throughout life is an important public health goal and, thus, the beneficial effects of exercise on the brain are becoming increasingly evident (Ang and Gomez-Pinilla, 2007). Studies in human and rodents have demonstrated that physical exercise has the capacity to enhance learning and memory (Kramer et al., 2006; Fordyce and Farrar, 1991) under a variety of conditions, from counteracting the mental decline associated with aging (Erickson and Kramer, 2009) to facilitating functional recovery in patients suffering from brain injury and diseases (Bohannon, 1993). Moreover, it has been demonstrated that performing exercise prior to brain trauma produces prophylactic effects on attendant brain damage, such as limiting the infarct size following forebrain ischemia (Endres et al., 2003) and inducing transoperative benefits in animal models of stroke (Hicks et al., 1998).

Among the variety of physical exercises most used in researches involving animals, treadmill running and swimming stand out (Carvalho et al., 2005; Prada et al., 2004). Although there are still doubts in regarding which exercise (swimming or treadmill running) would be the most suitable to avoid unnecessary stress to the animals, the use of swimming rats as a model of exercise presents advantages since swimming is a natural ability of the rats. In this context, studies using swimming as an animal model of training revealed the occurrence of adaptation to physical training similar to those observed in human beings (Voltarelli et al., 2002).

Although it is believed that physical exercise on general health and neurorehabilitation after traumatic brain injury may be useful (Ang and Gomez-Pinilla, 2007), little information is available regarding the prophylactic role of physical exercise on deleterious effects induced by TBI. In this study, we aimed to investigate whether previous swimming training protects against oxidative damage (protein carbonylation and TBARS) and neurochemical alterations (immunodetection of  $\alpha_1$  subunit and activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) after TBI.

## 2. Results

A significant increase in total body weight of sedentary versus trained rats along six weeks of swimming training [ $F(1,14)=6.94$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 1A] was observed. In addition, statistical analyses showed a clear stabilization of the blood lactate concentration in the trained group when compared with the sedentary group [ $F(1,12)=12.47$ ;  $P<0.04$ ; Fig. 1B], indicating that the training program increased the aerobic resistance of the animals (Gobatto et al., 2001).

Determination of TBARS content and protein carbonylation levels, 48 h after FPI or sham-operation procedure, are depicted in Figs. 2A and B, respectively. Statistical analysis revealed that FPI induces an increase of TBARS [ $F(2,41)=10.69$ ;  $P<0.001$ ] and protein carbonyl content [ $F(2,41)=5.81$ ;  $P<0.006$ ] in ipsilateral cortex in sedentary animals when compared with sham and naive group. On the other hand, statistical analysis also revealed that physical training protected against the increase of TBARS [ $F(2,41)=6.66$ ;  $P<0.03$ ; Fig. 2A] and protein carbonyl content [ $F(2,41)=5.62$ ;  $P<0.007$ ; Fig. 2B] in the ipsilateral cortex after FPI. Physical training also attenuated TBARS production [ $F(2,41)=7.05$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 2A] and protein carbonylation [ $F(2,41)=8.27$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 2A] in naive animals when compared with sham-operated animals, indicating that this protocol of physical training induces compensatory responses to oxidative stress in sham-operated animals.

Fig. 3 shows the effect of physical training and FPI on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, 48 h after FPI or sham-operation procedure. Statistical analyses revealed that FPI induces a decrease

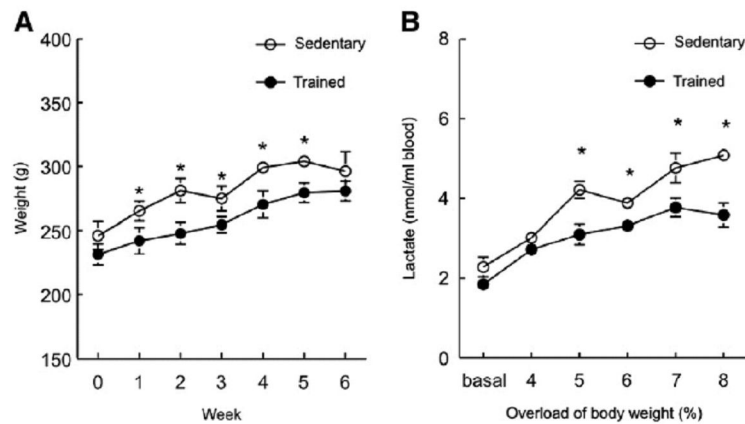


Fig. 1 – Effect of 6 weeks of swimming training on body weight (A) and lactate threshold assay (B). \* $P < 0.05$  compared with trained group (F test for simple effect). Data mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 6$  in each group.

in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals [ $F(2,41) = 5.33$ ;  $P < 0.009$ ], and that previous physical training protected against this inhibition [ $F(2,41) = 4.05$ ;  $P < 0.05$ ]. In order to investigate whether FPI-induced decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was due to a decrease in the levels of available enzyme molecules, we measured the

immunocontent of the  $\alpha_1$  subunit of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in cerebral cortex. Statistical analysis revealed that FPI decreased the immunocontent of the  $\alpha_1$  subunit of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals [ $F(2,41) = 7.35$ ;  $P < 0.002$ , Fig. 3B] and that previous physical training protected against this reduction [ $F(2,41) = 2.79$ ;  $P < 0.05$ ].

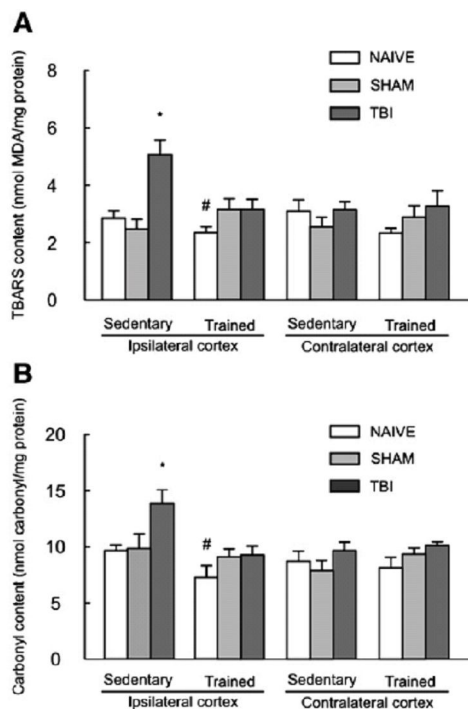


Fig. 2 – Physical training prevents TBI-induced TBARS (A) and protein carbonylation increase (B). Data are mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 8$  in each group. \* $P < 0.05$  compared to sham and naive sedentary group. # $P < 0.05$  compared with trained-FPI and sham trained groups (Student–Newman–Keuls test).

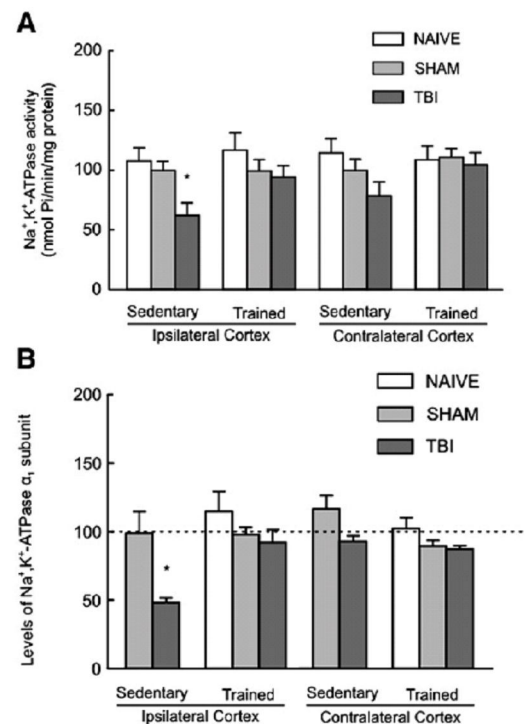


Fig. 3 – Effect of physical training and TBI on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (A) and  $\alpha_1$  subunit levels (B). Data are mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 8$  in each group. \* $P < 0.05$  compared to sham and naive group. (Student–Newman–Keuls test).

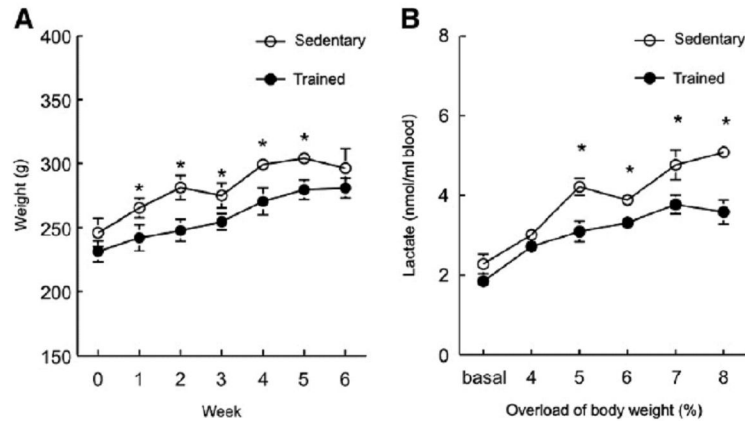


Fig. 1 – Effect of 6 weeks of swimming training on body weight (A) and lactate threshold assay (B). \*P<0.05 compared with trained group (F test for simple effect). Data mean±S.E.M. for n=6 in each group.

in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals [F(2,41)=5.33; P<0.009], and that previous physical training protected against this inhibition [F(2,41)=4.05; P<0.05]. In order to investigate whether FPI-induced decrease in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was due to a decrease in the levels of available enzyme molecules, we measured the

immunocontent of the α<sub>1</sub> subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in cerebral cortex. Statistical analysis revealed that FPI decreased the immunocontent of the α<sub>1</sub> subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals [F(2,41)=7.35; P<0.002, Fig. 3B] and that previous physical training protected against this reduction [F(2,41)=2.79; P<0.05].

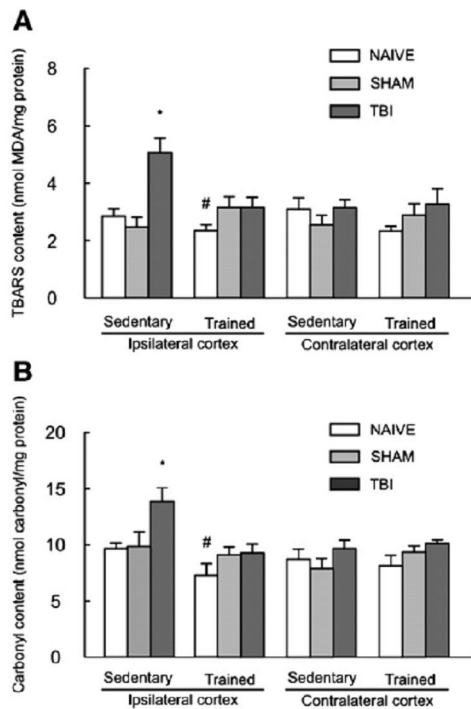


Fig. 2 – Physical training prevents TBI-induced TBARS (A) and protein carbonylation increase (B). Data are mean + S.E.M. for n=8 in each group. \*P<0.05 compared to sham and naive sedentary group. #P<0.05 compared with trained-FPI and sham trained groups (Student–Newman–Keuls test).

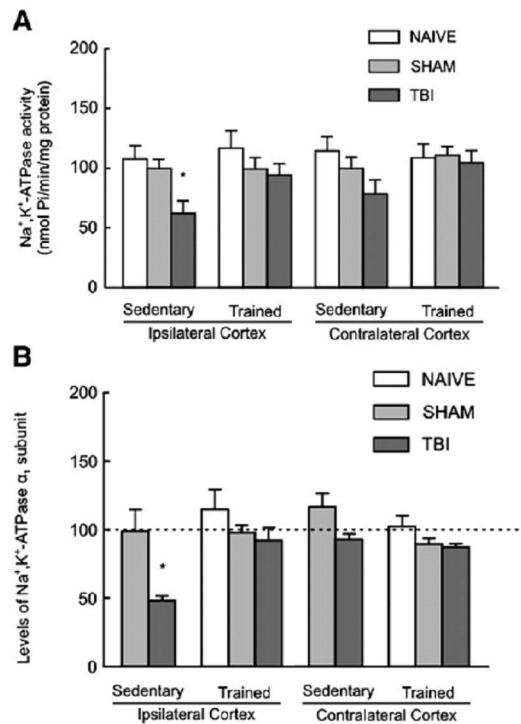


Fig. 3 – Effect of physical training and TBI on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity (A) and α<sub>1</sub> subunit levels (B). Data are mean + S.E.M. for n=8 in each group. \*P<0.05 compared to sham and naive group. (Student–Newman–Keuls test).

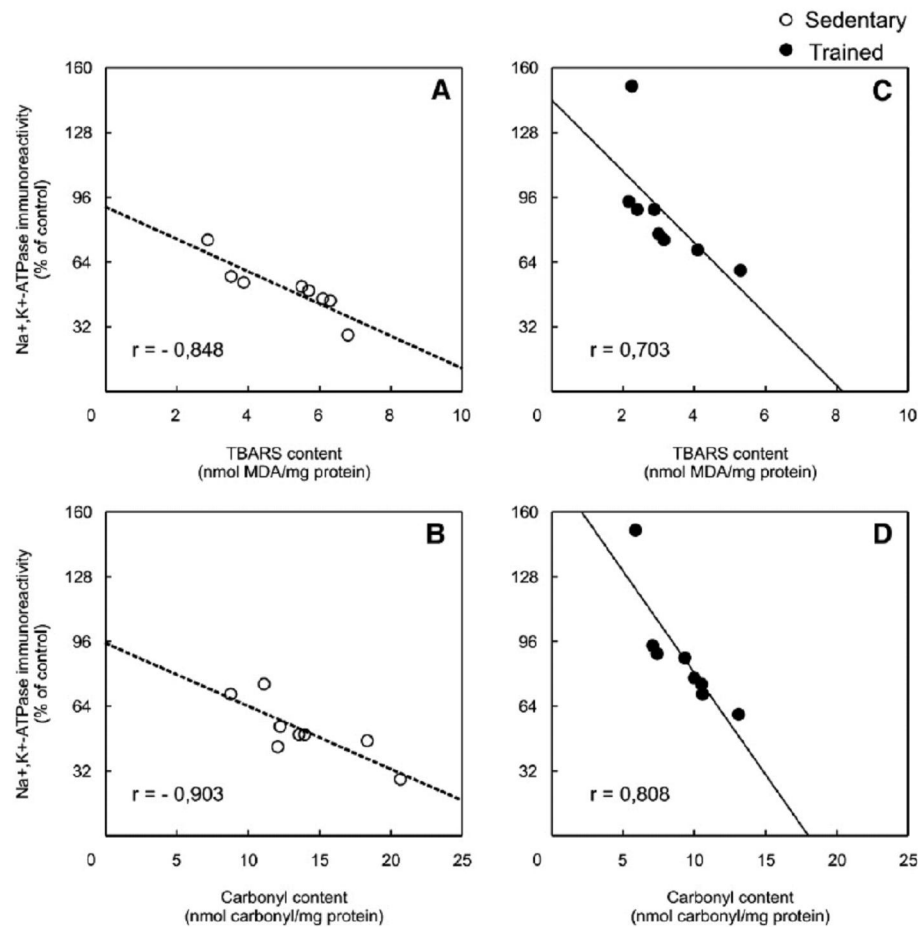


Fig. 4 – Correlation between the level of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit after TBI and TBARS production and protein carbonylation in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals (A and B) and in trained animals (C and D), respectively.

Considering that Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit is one of the targets for ROS and is directly involved in oxidative stress (Dada et al., 2003), we studied whether these events are interconnected in this model of TBI. Correlation analysis (Pearson's correlation analysis) revealed that reduction in the number of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit after FPI correlated with TBARS production ( $r = -0.848$ ;  $P < 0.009$ ; Fig. 4A) and protein carbonylation ( $r = -0.890$ ;  $P < 0.003$ ; Fig. 4B) in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals. In addition, the Pearson's correlation revealed negative correlation between TBARS production ( $r = 0.703$ ;  $P < 0.05$ ) and protein carbonyl content ( $r = 0.808$ ;  $P < 0.008$ ) with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit in ipsilateral cortex of animals trained after FPI.

### 3. Discussion

We have confirmed and extended our previous findings assuring that a single FPI episode in rat parietal cortex decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity with concomitant increase

in the levels of oxidative stress markers (Lima et al., 2008). Moreover, we have demonstrated a significant correlation between the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit with the increase of TBARS and protein carbonyl content after FPI. On the other hand, 6 weeks of swimming training protocol affords significant protection against FPI-induced TBARS formation, protein carbonylation and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition. These data agree with the assumption that adaptive responses to regular and moderate endurance exercise might reduce production of oxidants and a radical leak during oxidative phosphorylation (Packer et al., 2008). Furthermore, the negative correlation between TBARS and protein carbonyl content with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  subunit in animals trained after FPI reinforces the idea that compensatory responses to oxidative stress elicited by this protocol of physical training protect against the failure of some selected targets, such as Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme.

Concerns about increased death frequency after TBI and its potential for secondary injury have led to overprotective measures by many health care professionals (Werner and

Engelhard, 2007). Although a preinjury exercise regimen for humans may not be the most effective treatment since the time of injury cannot be predicted (Vaynman and Gomez-Pinilla, 2005), the protection exerted by physical training in this model of TBI is of particular interest because it supports the idea that physical training may exert prophylactic effects on brain damage after FPI. In line with this view, studies with humans and animals have demonstrated that previous physical training reduces the risk of stroke and heart attacks in men both with and without pre-existing ischemic heart disease (Wannamethee and Shaper, 1992) and reduces post-ischemic infarction and edema in brain of tested Sprague-Dawley rats (Stummer et al., 1994; Wang et al., 2001). Furthermore, preinjury exercise has been shown to have transoperative benefits in a model of Parkinsonism (Smith and Zigmond, 2003; Tillerson et al., 2003). Such studies intend to reduce the levels of initial damage, to limit long-term secondary degeneration, and to support neural repair or behavioral compensation (Kleim et al., 2003).

In the present study, we have showed that parameters that indicate generation of oxidative stress and collapses in ion gradient homeostasis in cortical homogenates were affected after FPI. These data, to some extent, agree with previous studies that have demonstrated that oxidative damage mediated by reactive oxygen and nitrogen species is well recognized as a significant component of the secondary injury cascade that accompanies TBI (Potts et al., 2006; Yilmaz et al., 2007).

It is worth pointing out that ROS generation is a necessary and unavoidable consequence of aerobic metabolism, and the rate of free radical or oxidant generation in biological tissue is closely related to oxygen consumption (Toldy et al., 2005). Consequently, it seems that mitochondria, in addition to being the sources of oxidant production, are also targets of oxidants (Boveris and Navarro, 2008). In this context, a significant number of studies have proposed that post-traumatic sequelae establish conditions of increased metabolic demands on the reduced mitochondrial population, resulting in the depletion of metabolic substrate such as glucose and pyruvate (Vink et al., 1994; Bentzer et al., 2000; Stahl et al., 2001) due to a reduction in metabolic enzyme activity (cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase) (Hovda et al., 1991).

Considering that the significant adaptive response to regular exercise involves the increase of  $O_2$  consumption and mitochondrial biogenesis (Packer et al., 2008; Boveris and Navarro, 2008), it is plausible to propose that previous physical training may result in improved ability of the neuron to withstand TBI-mediated energy depletion and consequently ROS generation (Soustiel and Sviri, 2007; Opii et al., 2007). This hypothesis has been upheld in animal studies that indicate that significant adaptive response to regular exercise involves greatly increased endurance capacity, permitted by the increase of  $O_2$  consumption and mitochondrial biogenesis (Packer and Cadenas, 2007; Boveris and Navarro, 2008).

Though treadmill running is mentioned as the most used exercise type in experiments with animals (Daggan et al., 2000; Carvalho et al., 2005), the use of swimming rats physical exercise model presents advantages over treadmill running. For instance, swimming is a natural ability of the rat, and this avoids the selection of the animals, which is necessary in

experimental protocols using treadmill running (Arida et al., 1999). Moreover, the difficulty for velocity maintenance and presence of electric stimulus as stress factor are additional pitfalls of the treadmill running (Gobatto et al., 2001). Despite such methodological differences, both swimming and treadmill running seems to be good models for investigate the effects of physical training on laboratory animals. In this context, we found a clear stabilization of the blood lactate concentration in trained versus sedentary rats in the lactate threshold test. Since previous studies have suggested that stabilization of blood lactate in trained animals is due to muscle aerobic adaptations leading to lower lactate production and/or increased blood lactate removal for the same relative and absolute workload (Jones and Carter, 2000; Gladden, 2000; Donovan and Pagliassotti, 2000), our results are in agreement with the idea that swimming training is an effective protocol to induce muscle aerobic adaptations in rats, similar to those observed in human beings (Voltarelli et al., 2002).

In the present study, we also revealed that FPI decreased  $Na^+,K^+$ -ATPase activity and the immuncontent of the  $\alpha_1$  subunit of  $Na^+,K^+$ -ATPase. In addition, the negative correlation between the number of  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha_1$  subunits with TBARS and protein carbonylation increase in the ipsilateral cerebral cortex of sedentary animals after FPI suggest that  $Na^+,K^+$ -ATPase enzyme is one cellular oxidative stress target (Dobrota et al., 1999).

Although it is believed that the  $Na^+,K^+$ -ATPase activity can be regulated by changes in catalytic activity brought about by changes in affinity for its major substrates (Ross and Soltesz, 2000), it is plausible to propose that  $Na^+,K^+$ -ATPase activity is regulated by endocytosis or exocytosis of  $Na^+$  pump molecules between the plasma membrane and intracellular compartments (Bertorello et al., 1999; Chibalin et al., 1999) after FPI. In line with this view, experimental findings in epithelial cells exposed to hypoxia through mitochondria generated-ROS activate an intracellular signaling pathway, triggering the endocytosis of  $Na^+,K^+$ -ATPase molecules through the activation of PKC- $\zeta$  and phosphorylation of Ser-18 of the  $\alpha_1$  subunit of  $Na^+,K^+$ -ATPase (Dada et al., 2003; Chen et al., 2006). However, further in-depth studies are necessary to definitively establish the mechanism involved.

Experimental findings did not demonstrate directly the definitive target of physical exercise mediated neuroprotection after FPI. However, the strong inverse correlation between TBARS production and protein carbonyl content with  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha_1$  subunit in trained rats suggests that the prophylactic effect elicited by physical training in this model of TBI was due to compensatory responses to oxidative stress and consequent maintenance of  $Na^+,K^+$ -ATPase structure. This is particularly important considering that mitochondrial oxidative damage precedes the onset of neuronal loss after TBI (Singh et al., 2006) and the phosphorylation of the  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha_1$  subunit mediated by mitochondria-ROS generation constitutes the triggering mechanisms that initiate its endocytosis (Chen et al., 2006). Thus, a reduction of mitochondrial-ROS generation induced by physical training (Boveris and Navarro, 2008) may protect against  $Na^+,K^+$ -ATPase inhibition and progressive pathobiological changes induced by TBI (Ross and Soltesz, 2000; Jain, 2008).

It is also important to point out that a significant increase in total body weight in sedentary versus trained rats was observed along the six weeks of the swimming training. The difference in body weight between sedentary and trained rats may be explained by changes in body composition. For instance, a decrease in subcutaneous adipose tissue of trained rats may explain why body mass was lower in this group. Since we have not determined body composition in the present study, this explanation remains speculative in nature, and further studies are necessary to determine the mechanisms involved. In addition, the clear stabilization of the blood lactate concentration in the trained group when compared with sedentary group for the lactate threshold assay suggests that the training program increased aerobic resistance of the animals (Gobatto et al., 2001).

In conclusion, the present study reports that FPI increased the levels of oxidative stress markers followed by inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and  $\alpha_1$  subunit decrease. In addition, the effective protection exerted by previous physical training against these deleterious effects provides a framework to guide further studies to examine the mechanisms by which exercise alters neuronal functions and thus, delay or prevent secondary cascades that lead to long-term cell damage and neurobehavioral disability after TBI.

#### 4. Experimental procedures

##### 4.1. Animal and reagents

All experiments involving the animals were conducted in conformance with the policy statement of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort. In the present study 90-day-old male Wistar rats, weighing 220–260 g at the beginning and 270–320 g at the end of the experimental period were used. During this period, the animals were maintained in a controlled environment (12:12 h light–dark cycle,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as to minimize their suffering. Reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

##### 4.2. Adaptation to the water

All rats were adapted to water before the beginning of the experiment. The adaptation consisted of keeping the animals in shallow water at  $32^\circ\text{C}$  between 9:00 and 11:00 a.m. The adaptation period proceeded during the entire experimental period, and the purpose of the adaptation was to reduce stress without promoting a physical training adaptation.

##### 4.3. Swimming training protocol and lactate threshold assay

The use of swimming rats as a model of exercise presents advantages over treadmill running, since swimming is a natural

ability of the rats. This feature avoids the selection of animals, which is necessary in experimental protocols using treadmill running (Arida et al., 1999). For exercise training, rats were randomly assigned to the following groups: trained/naive, trained/sham craniotomy and trained/TBI. The training period lasted 6 week and consisted of 60-min daily sessions five times per week. Swimming was always performed in water at a temperature of  $32^\circ\text{C}$  between 9:00 and 11:00 a.m. All animals underwent a swimming adaptation period without weights during the first week of training. After the swimming adaptation period, the rats were subjected to swimming training with a workload (5% of body weight) to improve endurance (Gobatto et al., 2001). Together with the training session, sedentary rats were placed in the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at  $32^\circ\text{C}$  for 30 min, 5 days/week without a workload (5% of body weight). After six weeks of training, a test protocol was used to determine the lactate threshold (LT) in sedentary ( $n=7$ ) and trained rats ( $n=7$ ). The LT test was carried out according to the protocol described by Marquezi et al. (2003) and consisted of swimming exercises with progressive overload through weights attached to the animal's tail, corresponding to 4%, 5%, 6%, 7%, and 8% of body weight of each animal for 3-min periods, separated by 1-min resting periods. During the resting periods, 25  $\mu\text{l}$  blood samples were collected from the tail vein into heparinized capillary tubes for determination of lactate concentration. The LT for each animal was calculated based on the point of inflection of the graph when plotting lactate concentration against the corresponding exercise workload.

##### 4.4. Traumatic brain injury

After six weeks of training, the sedentary and trained rats underwent lateral fluid percussion injury (FPI). Rats assigned to sham groups were anesthetized and connected to the injury device, but received no injury. The FPI was carried out as described previously (D'Ambrosio et al., 1999; 2004). Briefly, animals were anesthetized with a single i.p. injection of Equithesin (6 ml/kg), a mixture containing sodium pentobarbital (58 mg/kg), chloral hydrate (60 mg/kg), magnesium sulfate (127.2 mg/kg), propylene glycol (42.8%), and absolute ethanol (11.6%) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. A burr hole of 3 mm in diameter was drilled on the right convexity, 2 mm posterior to the bregma and 3 mm lateral to the midline, taking care to keep the dura mater intact. A plastic injury cannula was placed over the craniotomy with dental cement. When the dental cement hardened, the cannula was filled with Chloramphenicol, closed with a proper plastic cap and the animal was removed from the stereotaxic device and returned to its homecage. After 24 h, the animals were anesthetized with Halothane, and had the injury cannula attached to the fluid percussion device and placed in a heatpad maintained at  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

TBI was produced by a fluid percussion device developed in our laboratory. A brief (10–15 ms) transient pressure fluid pulse ( $3.53 \pm 0.17$  atm) impact was applied against the exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (Fluid Control Automação Hidráulica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Gould Ltd., Essex, UK). Sham-operated animals underwent an identical

procedure, with the exception of the fluid percussion injury (FPI). Immediately after these procedures, the cannula was removed and the orifice was covered with dental cement. Naive rats underwent randomization with no further intervention.

#### 4.5. Tissue processing for neurochemical analyses

Considering that the early free radical generation (3 to 72 h) has been postulated to lead to oxidative damage and adversely affect synaptic function and plasticity after TBI (Singh et al., 2006; Ansari et al., 2008), the animals were killed by decapitation 48 h after TBI and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. The cerebral cortex was rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish and divided in ipsilateral and contralateral cortex. Each tissue sample was homogenized in cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and then divided in aliquots for subsequent neurochemical analyses, as described below.

#### 4.6. Measurement of TBARS content

TBARS content was estimated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% SDS, 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was finally made up to 2 ml with type I ultrapure water and heated at 95 °C for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm (Ohkawa et al., 1979).

#### 4.7. Measurement of the protein carbonyl content

Total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), adapted for brain tissue (Oliveira et al., 2004). Briefly, homogenates were diluted to 750–800 µg/ml of protein in each sample, and 1 ml aliquots were mixed with 0.2 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.2 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 0.6 ml of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.8 ml of heptane (99.5%), and 1.8 ml of ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank) and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, as described by Levine et al. (1990).

#### 4.8. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity measurement

Assay of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was performed according to Wyse et al. (2000). Briefly, the reaction medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 µg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 350 µl. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 5 mM. After 30 min at

37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 µl of trichloroacetic acid (TCA, 50%). Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-sensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

#### 4.9. Immunodetection of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub> subunit

In order to investigate whether the possible alteration of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after TBI and physical training was due to a decrease or increase in the levels of available enzyme molecules, we performed immunodetection analysis for the α subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in cerebral cortex. Slot blot analysis was used for quantification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub> subunit levels, according to the procedures described by Banjac et al., 2001, with minor modifications. Briefly, cerebral cortex (ipsi and contralateral site) was homogenized in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and centrifuged at 800 g at 4 °C for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 16,000 g at 4 °C for 20 min. The pellet was re-suspended in 5 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and protein content was normalized to 3 µg/ml. Next, 250 µl of these homogenized were loaded in each well on a nitrocellulose membrane under vacuum using a slot blot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membrane was blocked with 4% (w/v) fat-free dry milk in PBS, containing 0.04% (v/v) Tween 20 for 2 h and incubated with a 1:4000 dilution of anti-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α subunit polyclonal antibody in PBS, containing 0.01% (w/v) sodium azide and 0.04% (v/v) Tween 20 (PBS) for 1 h. The membrane was washed three times in PBS and was incubated for 1 h with an anti-alkaline phosphatase secondary antibody diluted in PBS in a 1:8000 ratio. The membrane was washed for three times in PBS for 5 min and developed using the BCIP/NBT method. Blots were dried, scanned with Adobe Photoshop, and quantified with Scion Image (PC version of Macintosh compatible NIH image).

#### 4.10. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

#### 4.11. Statistical analyses

Data from body weight and blood lactate concentration were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Data from total protein carbonylation, TBARS, immunodetection of α<sub>1</sub> subunit and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity determinations *ex vivo* were analyzed by three-way ANOVA. Post hoc analyses were carried out by the F test simple effect or the Student–Newman–Keuls, when appropriate. All data are expressed as mean ± S.E.M. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient. P < 0.05 was considered significant.



## Acknowledgments

Work supported by CNPq (grant: 500120/2003-0). C.F. Mello and A.F. Furian are the recipients of CNPq fellowships. M.S. Oliveira is the recipient of a CAPES fellowship. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. In addition, we would like to state that all authors have seen and approved the study and that no part of the work has been published or is under consideration for publication elsewhere. Moreover, the present study was supported by government funding and has no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest. We also would like to declare that all experiments were carried out according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, and that the University Ethics Committee approved the respective protocols.

## REFERENCES

- Ang, E.T., Gomez-Pinilla, F., 2007. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr. Med. Chem.* 14, 2564–2571.
- Ansari, M.A., Roberts, K.N., Scheff, S.W., 2008. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 443–452.
- Arida, R.M., Scorza, F.A., dos Santos, N.F., Peres, C.A., Cavalheiro, E.A., 1999. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res.* 37, 45–52.
- Banjac, A., Nedeljkovic, N., Horvat, A., Kanazir, D., Nikezic, G., 2001. Ontogenetic profile of ecto-ATPase activity in rat hippocampal and caudate nucleus synaptic plasma membrane fractions. *Physiol. Res./Acad. Sci. Bohemoslovaca* 50, 411–417.
- Bentzer, P., Davidsson, H., Grande, P.O., 2000. Microdialysis-based long-term measurements of energy-related metabolites in the rat brain following a fluid percussion trauma. *J. Neurotrauma* 17, 441–447.
- Bertorello, A.M., Ridge, K.M., Chibalin, A.V., Katz, A.I., Sznajder, J.I., 1999. Isoproterenol increases Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by membrane insertion of alpha-subunits in lung alveolar cells. *Am. J. Physiol.* 276, L20–27.
- Bohannon, R.W., 1993. Physical rehabilitation in neurologic diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 6, 765–772.
- Boveris, A., Navarro, A., 2008. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life* 60 308–314.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Carvalho, J.F., Masuda, M.O., Pompeu, F.A.M., 2005. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol. A* 140, 409–413.
- Chen, Z., Krmar, R.T., Dada, L., Efindiev, R., Leibiger, I.B., Pedemonte, C.H., Katz, A.I., Sznajder, J.I., Bertorello, A.M., 2006. Phosphorylation of adaptor protein-2 mu2 is essential for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase endocytosis in response to either G protein-coupled receptor or reactive oxygen species. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 127–132.
- Chibalin, A.V., Ogimoto, G., Pedemonte, C.H., Pressley, T.A., Katz, A.I., Feraille, E., Berggren, P.O., Bertorello, A.M., 1999. Dopamine-induced endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 1920–1927.
- Dada, L.A., Chandel, N.S., Ridge, K.M., Pedemonte, C., Bertorello, A.M., Sznajder, J.I., 2003. Hypoxia-induced endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J. Clin. Invest.* 111, 1057–1064.
- Daggan, R.N., Zafeiridis, A., Dipla, K., Puglia, C.D., Gratz, I., Catalano, E., Kendrick, C.V., 2000. The effects of chronic exercise on anesthesia induced hepatotoxicity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 2024–2028.
- D'Ambrosio, R., Maris, D.O., Grady, M.S., Winn, H.R., Janigro, D., 1999. Impaired K<sup>+</sup> homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J. Neurosci.* 19, 8152–8162.
- D'Ambrosio, R., Fairbanks, J.P., Fender, J.S., Born, D.E., Doyle, D.L., Miller, J.W., 2004. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain* 127, 304–314.
- Davis, L.M., Pauly, J.R., Readnower, R.D., Rho, J.M., Sullivan, P.G., 2008. Fasting is neuroprotective following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* 86, 1812–1822.
- Dencher, N.A., Frenzel, M., Reifschneider, N.H., Sugawa, M., Krause, F., 2007. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100, 291–298.
- Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurella, E.G., Boldyrev, A.A., 1999. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol. Neurobiol.* 19, 141–149.
- Donovan, M., Pagliassotti, M.J., 2000. Quantitative assessment of pathways for lactate disposal in skeletal muscle fiber types. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 772–777.
- Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schrock, H., Nickenig, G., Kuschinsky, W., Dirnagl, U., Laufs, U., 2003. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann. Neurol.* 54, 582–590.
- Erickson, K.I., Kramer, A.F., 2009. Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br. J. Sports Med.* 43, 22–24.
- Faden, A.I., Demediuk, P., Panter, S.S., Vink, R., 1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798–800.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400.
- Fordyce, D.E., Farrar, R.P., 1991. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav. Brain Res.* 46, 123–133.
- Gladden, L.B., 2000. Muscle as a consumer of lactate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 764–771.
- Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 130, 21–27.
- Hicks, R.R., Boggs, A., Leider, D., Kraemer, P., Brown, R., Scheff, S.W., Serogy, K.B., 1998. Effects of exercise following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 12, 41–47.
- Hovda, D.A., Yoshino, A., Kawamata, T., Katayama, Y., Becker, D.P., 1991. Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Brain Res.* 567, 1–10.
- Jain, K.K., 2008. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov. Today* 13, 1082–1089.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7, 333–337.
- Jones, M., Carter, H., 2000. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Med.* 29, 373–376.

- Kleim, J.A., Jones, T.A., Schallert, T., 2003. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem. Res.* 28, 1757–1769.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101, 1237–1242.
- Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A., 1990. The neurotoxicity of ouabain, a sodium–potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 120, 159–162.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Lima, F.D., Souza, M.A., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Martignoni, F.V., Hoffmann, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F., Oliveira, M.S., de Mello, C.F., 2008. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav. Brain Res.* 193, 306–310.
- Li, S., Stys, P.K., 2001. Na<sup>+</sup>(+)-K<sup>+</sup>(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107, 675–683.
- Marquezi, M.L., Roschel, H.A., dos Santa Costa, A., Sawada, L.A., Lancha Jr, A.H., 2003. Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 13, 65–75.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oliveira, M.S., Flavia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Figuera, M., de Carvalho Myskiw, J., Gindri Fiorenza, N., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylene-tetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Opii, W.O., Nukala, V.N., Sultana, R., Pandya, J.D., Day, K.M., Merchant, M.L., Klein, J.B., Sullivan, P.G., Butterfield, D.A., 2007. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24, 772–789.
- Osteen, C.L., Moore, A.H., Prins, M.L., Hovda, D.A., 2001. Age-dependency of 45 calcium accumulation following lateral fluid percussion: acute and delayed patterns. *J. Neurotrauma* 18, 141–162.
- Packer, L., Cadenas, E., 2007. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic. Res.* 41, 951–952.
- Packer, L., Cadenas, E., Davies, K.J., 2008. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 123–125.
- Pari, L., Murugavel, P., 2007. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology* 234, 44–50.
- Potts, M.B., Koh, S.E., Whetstone, W.D., Walker, B.A., Yoneyama, T., Claus, C.P., Manvelyan, H.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2006. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 3, 143–153.
- Prada, F.J.A., Voltarelli, F.A., De Oliveira, C.A., Gobatto, C.A., de Mello, M.A., 2004. Condicionamento anaeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *R. Bras. Cien. Mov.* 12, 29–34.
- Ross, S.T., Soltesz, I., 2000. Selective depolarization of interneurons in the early posttraumatic dentate gyrus: involvement of the Na<sup>+</sup>(+)/K<sup>+</sup>(+)-ATPase. *J. Neurophysiol.* 83, 2916–2930.
- Shao, C., Roberts, K.N., Markesbery, W.R., Scheff, S.W., Lovell, M.A., 2006. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 77–85.
- Siems, W.G., Hapner, S.J., van Kuijk, F.J., 1996. 4-hydroxynonenal inhibits Na<sup>+</sup>(+)-K<sup>+</sup>(+)-ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 215–223.
- Singh, I.N., Sullivan, P.G., Deng, Y., Mbye, L.H., Hall, E.D., 2006. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1407–1418.
- Smith, A.D., Zigmond, M.J., 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp. Neurol.* 184, 31–39.
- Soustiel, J.F., Sviri, G.E., 2007. Monitoring of cerebral metabolism: non-ischemic impairment of oxidative metabolism following severe traumatic brain injury. *Neurol. Res.* 29, 654–660.
- Stahl, N., Ungerstedt, U., Nordstrom, C.H., 2001. Brain energy metabolism during controlled reduction of cerebral perfusion pressure in severe head injuries. *Intensive Care Med.* 27, 1215–1223.
- Stummer, W., Weber, K., Tranmer, B., Baethmann, A., Kempster, O., 1994. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 25, 1862–1869.
- Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., Waldmeier, P.C., Springer, J.E., 2005. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J. Neurosci. Res.* 79, 231–239.
- Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reveron, M.E., Miller, G.W., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 119, 899–911.
- Toldy, A., Stadler, K., Sasvari, M., Jakus, J., Jung, K.J., Chung, H.Y., Berkes, I., Nyakas, C., Radak, Z., 2005. The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65, 487–493.
- Varma, S., Janesko, K.L., Wisniewski, S.R., Bayir, H., Adelson, P.D., Thomas, N.J., Kochanek, P.M., 2003. F<sub>2</sub>-isoprostane and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *J. Neurotrauma* 20, 781–786.
- Vaynman, S., Gomez-Pinilla, F., 2005. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil. Neural. Repair* 19, 283–295.
- Vink, R., Golding, E.M., Headrick, J.P., 1994. Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 11, 265–274.
- Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., de Mello, M.A., 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (11), 1389–1394.
- Wang, R.Y., Yang, Y.R., Yu, S.M., 2001. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Res.* 922, 140–143.
- Wannamethee, G., Shaper, A.G., 1992. Physical activity and stroke in British middle aged men. *BMJ* 304, 597–601.
- Werner, C., Engelhard, K., 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.* 99, 4–9.
- Wyse, A.T., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.I., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11, 2331–2334.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Yilmaz, G., Surer, H., Inan, L.E., Coskun, O., Yucel, D., 2007. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. *Tohoku. J. Exp. Med.* 211, 23–30.

---

## 5. DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

O traumatismo crânio-encefálico (TCE) é uma das principais condições determinantes de incapacidade e mortalidade em pessoas entre 1 e 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 à grande variedade de condições associadas ao TCE, há um considerável interesse no desenvolvimento e posterior aplicação de marcadores bioquímicos que relacionem a gravidade do dano cerebral com o desenvolvimento de problemas neurológicos, como déficits de memória e aprendizado. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, no primeiro momento, investigar se o dano oxidativo a alvos específicos da célula após o TCE está envolvido no déficit cognitivo após certo período de tempo. Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho revelaram que os animais que sofreram o TCE apresentaram uma diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, um aumento nos níveis de marcadores de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonil) e um déficit no aprendizado de memória espacial um e três meses após o trauma. Cabe salientar que a diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase evidenciada no terceiro mês foi maior quando comparada com o primeiro mês após o TCE. Este conjunto de resultados sugere que o déficit cognitivo evidenciado neste modelo de TCE se deve, em parte, ao aumento na geração de radicais livres que ocorre concomitantemente com uma diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

Apesar de estar bem descrito na literatura que o TCE tem como conseqüências o déficit cognitivo (memória e aprendizado) (COHEN et al., 2007; SALMOND & SAHAKIAN, 2005) e 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 curar estas conseqüências (MAAS, 2001; NARAYAN et al., 2002; TOLIAS & BULLOCK, 2004), pois os mecanismos que

delineiam o aparecimento destes problemas neurológicos ainda precisam ser definidos.

Uma das teorias para déficit cognitivo induzido pelo TCE seria a morte neuronal, entretanto nem sempre as funções motoras e cognitivas são afetadas pela perda celular. De fato, Royo e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento com neurotrofina-4/5, uma proteína essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso, protege contra a perda neuronal, mas não contra o déficit de memória espacial induzido pelo TCE, sugerindo que o déficit cognitivo pode estar relacionado a outras vias de toxicidade como a ativação da cascata de eventos excitotóxicos e estresse oxidativo (POTTS, 2006; SAKELLARIS et al., 2006; PALMER, 1993).

Na medida em que excitotoxicidade celular é um evento chave na patofisiologia do TCE (ZINK, 2001), a possibilidade de utilização de marcadores bioquímicos que possam ser associados a alterações de neuroimagem e que tenham valor prognóstico é de grande importância no manejo dos pacientes com TCE grave. Neste contexto, o aumento extracelular dos níveis de glutamato no líquido de pacientes após TCE tem sido descrito como o evento primário que desencadeia a ativação de outros fatores envolvidos na injúria celular cerebral (GHAJAR, 2000).

Dentre os diversos fatores envolvidos na fisiopatologia após o TCE, pode-se destacar o aumento na liberação de aminoácidos excitatórios que pode levar à morte neuronal devido à estimulação excessiva de seus receptores e aumento na geração de radicais livres (ROTHMAN, et al., 2007; BELLISSIMO, et al., 2001). Essa cascata de eventos pode ativar um grande número de toxinas envolvidas no fenômeno da neurotoxicidade, dentre as quais o radical hidroxil (OH), um dos mais potentes radicais livres envolvidos em diversas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Huntington (SRINIVASAN et al., 2005), Alzheimer e esquizofrenia (MAHADIK & MUKHERJEE, 1996). O radical hidroxil é capaz de reagir com fosfolipídios e proteínas de membrana, induzindo a uma lipoperoxidação e à oxidação protéica e, provavelmente, à morte neuronal (MAHADIK & MUKHERJEE, 1996), assim como é capaz de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes “in vitro” (PUNTARULO, et al., 1999). Desta forma, o aumento da produção de TBARS e carbonilação protéica evidenciado no presente estudo sugere que o estresse oxidativo exerce um papel chave na degeneração neuronal pós TCE. Além disso, estes achados experimentais corroboram com o dano a membranas pelos radicais livres que ocorre comumente em pacientes com TCE (ZINK, 2001).

No que se refere à especificidade dos mecanismos envolvidos nesta toxicidade, o presente estudo também evidenciou uma significativa diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, uma enzima sensível ao ataque dos radicais livres (LEES, 1991; BOLDYREV et al., 1995). Na medida em que a enzima  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase é uma proteína integral de membrana, a mesma se torna um alvo fácil ao ataque dos radicais livres na membrana lipídica, principalmente no cérebro, uma estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais são altamente suscetíveis à lipoperoxidação. Pierre e colaboradores (1999), mostraram que mudanças na atividade da  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase são acompanhadas por aumento do nível de MDA, um produto final da lipoperoxidação. De forma semelhante Lees (1991), sugere que alterações na atividade da  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase podem estar relacionadas a alterações na membrana celular induzidas por lipoperoxidação, via radicais livres produzidos durante a isquemia.

Da mesma forma que a lipoperoxidação induz a uma diminuição da atividade desta enzima, diversos estudos tem evidenciado uma significativa correlação entre a carbonilação protéica (DEAN et al., 1997) com a diminuição da funcionalidade protéica de diversas enzimas presentes na célula, como  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase (DALLE-DONNE et al., 2003). Dobrota et al. (1999) sugere que as mudanças oxidativas da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase fazem com que as suas moléculas percam a habilidade de interação e, com isso, levem à diminuição da taxa de hidrólise. Outro dado já bem descrito na literatura é a relação entre a inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase com a diminuição no desempenho de tarefas cognitivas (KAWAKAMI & IKEDA, 2006; Geering, 2008), onde a injeção intracerebroventricular de ouabaína, inibidor seletivo da enzima, induz a um défict no aprendizado espacial no teste do labirinto aquático de Morris. Além disso, pesquisas com camundongos “knock-out” para a subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase apresentam déficits severos de memória e aprendizado no mesmo teste (MOSELEY et al., 2007).

Em resumo, neste trabalho, demonstra-se que um evento de TCE causa défict no teste de aprendizado da memória espacial, aumento dos marcadores de estresse oxidativo e diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Embora não se tenha ainda o exato entendimento sobre os mecanismos secundários envolvidos nesta fisiopatologia, os resultados apresentados representam uma nova visão acerca da participação dos radicais livres e da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no défict cognitivo causado pelo TCE.

Na medida em que a manutenção da saúde e plasticidade cerebral ao longo da vida é um importante objetivo de saúde pública, os efeitos benéficos do exercício físico sobre o cérebro estão se tornando cada vez mais evidentes. Neste contexto, acredita-se que o cérebro é responsivo à atividade física na medida em que os mecanismos de adaptação neurológica induzidos por diversos protocolos de treinamento físico estejam envolvidos na melhoria do aprendizado e memória (FORDYCE & FARRAR, 1991; KRAMER et al., 2006), no tratamento de declínios mentais relacionados com a idade, bem como na facilitação na recuperação de pacientes de doenças e dano cerebral (BOHANNON, 1993).

Apesar de estar envolvido no aumento da produção de ERO (RADAK et al., 2001), o exercício físico tem sido utilizado na neuroreabilitação após TCE (VITALE et al., 1996; GREALY et al., 1999; GRIESBACH et al., 2004b), uma vez que reduz os efeitos deletérios causados pelo aumento na geração de radicais livres (GOMEZ-PINILLA, 2008; GRIESBACH et al., 2008). Já quanto à especificidade dos mecanismos envolvidos na proteção induzida pelo exercício físico, os resultados obtidos na segunda etapa do trabalho revelaram que o treinamento físico prévio de seis semanas protege contra o dano oxidativo caracterizado pelo aumento de TBARS e carbonilação protéica induzidos pelo TCE. O exercício físico prévio também atenua os efeitos deletérios causados pelo TCE à enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase caracterizado pela inibição e diminuição de sua subunidade catalítica (subunidade  $\alpha$ ). Estes achados experimentais corroboram com prévios estudos que demonstram o envolvimento do dano oxidativo mediado por ERO com danos secundários que acompanham o TCE (POTTS et al., 2006; YILMAZ et al., 2007). Entretanto, é importante salientar que a geração de ROS é uma consequência necessária e inevitável do metabolismo aeróbico e que a taxa de radicais livres ou geração de oxidantes no tecido biológico é diretamente proporcional ao consumo de oxigênio (TOLDY et al., 2005). Consequentemente, a mitocôndria parece ser fonte de pró-oxidantes e, também, o seu alvo (BOVERIS & NAVARRO, 2008). Desta forma, vários estudos sugerem que as seqüelas pós-traumáticas estabelecem uma demanda metabólica aumentada e uma redução no número de mitocôndrias, o que resulta em uma depleção do substrato metabólico como glicose e piruvato (VINK et al., 1994; BENTZER et al., 2000; STAHL et al., 2001) por meio da redução na atividade das enzimas citocromo oxidase e succinato desidrogenase (HOVDA et al., 1991).

Considerando que o exercício gera respostas adaptativas ao aumento do consumo de oxigênio e biogênese mitocondrial (BOVERIS & NAVARRO, 2008; PACKER et al., 2008), é presumível propor que o exercício físico aumenta a capacidade de resistência, por parte dos neurônios, à depleção energética causada pelo TCE e, também, à geração de radicais livres (OPII et al., 2007; SOUSTIEL & SVIRI, 2007). Esta idéia tem sido sustentada por estudos com animais, os quais indicam que o aumento na capacidade de endurance permitida pelo aumento do consumo de oxigênio e biogênese mitocondrial são respostas adaptativas ao exercício regular (PACKER & CADENAS, 2008; BOVERIS & NAVARRO, 2008). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que o exercício tem a capacidade de exercer efeitos profiláticos, pois diminui os riscos de doenças cardíacas, em pessoas com ou sem este problema pré-existente (WANNAMETHEE & SHAPER, 1992), bem como reduz o infarto pós-isquêmico e edema cerebral em ratos “Sprague-Dawley” (STUMMER et al., 1994; WANG et al., 2001). O exercício prévio também exerce efeitos benéficos em modelos de Parkinsonismo (SMITH & ZIGMOND, 2003; TILLERSON et al., 2003) reduzindo os danos iniciais, limitando a degeneração secundária e fornecendo suporte à neuroregeneração ou compensação comportamental (RADAK et al., 2008; POTHAKOS et al., 2009).

Neste trabalho, dentre as opções de protocolo para o treinamento físico, a natação foi escolhida por oferecer vantagens sobre a corrida, uma vez que nadar é uma habilidade natural dos animais e exclui a seleção dos mesmos que pode ocorrer em outros protocolos experimentais (ARIDA et al., 1999), como o trabalho em esteira que é o mais usado neste tipo de trabalho (CARVALHO et al., 2005). Na esteira observa-se dificuldade de manutenção da velocidade e a presença de estímulos elétricos que podem atrapalhar os resultados (GOBATTO et al., 2001).

Conforme trabalhos anteriores do grupo (SOUZA et al., 2009; RAMBO et al., 2009), o exercício também teve a capacidade de estabilizar o lactato sanguíneo através de adaptações aeróbicas musculares, que levaram a uma baixa produção e/ou uma remoção aumentada deste lactato (DONOVAN & PAGLIASSOTI, 2000; GLADDEN, 2000; JONES & CARTER, 2000). Desta forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que o trabalho de natação induz adaptações aeróbicas musculares em ratos, similares às aquelas observadas em humanos (VOLTARELLI et al., 2002).



Outro resultado apresentado no presente trabalho foi a detecção, da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e do imunoconteúdo da subunidade  $\alpha$  da referida enzima. Os achados experimentais revelaram uma correlação negativa entre a quantidade de subunidades catalítica  $\alpha$  e o aumento da produção de TBARS e carbonilação protéica no lado ipsilateral do córtex cerebral dos animais sedentários que sofreram o TCE, sugerindo que a enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é um dos alvos do estresse oxidativo (DOBROTA et al., 1999). Acredita-se que a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase possa ser regulada por mudanças catalíticas em consequência de mudanças na afinidade pelo seu maior substrato, no caso o ATP (ROSS & SOLTESZ, 2000). Por outro lado, é possível propor que a atividade da enzima também possa ser regulada por endocitose ou exocitose das moléculas entre a membrana plasmática e o compartimento intracelular (BERTORELLO et al., 1999; CHIBALIN et al., 1999) após o TCE. Nesta linha de raciocínio, estudos “in vitro” realizados em células epiteliais expostas à hipóxia demonstram que EROs geradas pela mitocôndria ativam vias de sinalização intracelular que levam à endocitose das moléculas da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase por meio da ativação da PKC- $\zeta$  e da fosforilação da SER-18 da subunidade  $\alpha$  da enzima (DADA et al., 2003; CHEN et al., 2006). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para estabelecer definitivamente os mecanismos envolvidos na inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase após o TCE.

Apesar disso, a significativa correlação entre a produção de TBARS e o conteúdo de carbonilação protéica com a subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase evidenciada nos animais treinados sugere que o efeito profilático do treinamento físico neste modelo de TCE ocorreu por respostas compensatórias ao estresse oxidativo e, conseqüente, manutenção da estrutura da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Cabe salientar que o dano oxidativo precede o início da perda neuronal após o TCE (SINGH et al., 2006) e que a fosforilação da subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase mediada por geração de ROS inicia o mecanismo que gera a endocitose (CHEN et al., 2006). Desta forma, é plausível propor que uma redução da geração EROs induzida pelo exercício físico (BOVERIS & NAVARRO, 2008) pode proteger contra a inibição da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e das mudanças induzidas pelo TCE (ROSS & SOLTESZ, 2000; JAIN, 2008).

---

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, pode-se concluir que:

### 6.1 Capítulo I

1. O TCE causou déficit no teste de aprendizado na memória espacial na medida em que aumentou a latência de escape e o número de erros no teste de Barnes Maze tanto em um quanto em três meses após o trauma.
2. O dano oxidativo caracterizado pelo aumento no conteúdo de proteína carbonil e TBARS após TCE possui um importante papel no dano secundário evidenciado neste modelo de traumatismo. Esta hipótese tem sido sustentada pelo aumento da carbonilação protéica e pela lipoperoxidação causada pelo TCE com o passar do tempo (um e três meses após o trauma).
3. Os resultados do trabalho revelaram um decréscimo na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no lado ipsilateral do córtex parietal após um e três meses ao TCE. Na medida em que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase exerce um importante papel na manutenção do potencial de membrana nas células neuronais, é plausível propor que a inibição da atividade desta enzima causada pela geração de EROs possa estar envolvida com déficit cognitivo ao passar do tempo após TCE.

## 6.2 Capítulo II

1. No presente estudo, o exercício exerceu efeito profilático contra o dano oxidativo caracterizado pelo aumento no conteúdo de proteína carbonil e TBARS após TCE. Cabe salientar que o efeito protetor exercido pelo exercício neste modelo de injúria se deva, provavelmente, pelo seu efeito antioxidante *per se*. Esta hipótese esta embasada em resultados que demonstraram uma diminuição na produção de TBARS e na carbonilação protéica em grupos de ratos treinados quando comparados com ratos sedentários.

2. O TCE causou uma diminuição no imunconteúdo da subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e o exercício físico prévio protegeu contra esta diminuição. Além disso, a significativa correlação entre a produção de TBARS e o conteúdo de proteína carbonil com a subunidade  $\alpha$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase evidenciada nos animais treinados sugere que as respostas compensatórias induzidas pelo treinamento físico prévio protege contra estresse oxidativo e, conseqüente, manutenção da estrutura da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase neste modelo de traumatismo.

3. O TCE causou uma diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e no imunconteúdo da subunidade  $\alpha$  do hemisfério ipsilateral do córtex dos animais sedentários. Análise estatística (Correlação de *Pearson*) também revelou uma correlação negativa entre a atividade e a quantidade de subunidades catalítica  $\alpha$  com o aumento da produção de TBARS e carbonilação protéica em animais que sofreram TCE. Estes achados experimentais corroboram com a literatura de que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um alvo específico ao ataque dos radicais livres e sugerem o envolvimento desta enzima na neurodegeneração secundária induzida pelo TCE.

Em resumo, no presente estudo demonstra-se que as mudanças na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são acompanhadas por aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo concomitantemente com o déficit no teste de aprendizado na memória espacial após TCE. Os achados experimentais também revelam uma correlação negativa entre a atividade e a quantidade de subunidades catalítica  $\alpha$  com o aumento da produção de TBARS e carbonilação protéica em animais que sofrem o TCE, sugerindo que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um dos alvos do estresse oxidativo neste modelo de injúria. Além disso, os resultados apresentados no presente estudo revelam que o exercício físico exerce efeito profilático contra o dano oxidativo e a inibição da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causada pelo TCE. A partir destes achados, sugere-se que a efetiva proteção exercida pelo exercício físico no dano neuronal induzido pelo TCE se deve à proteção de alvos específicos à ação de radicais livres, como a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

---

## **7. BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABEL T, KANDEL E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain research: Brain research review**, v. 26, n. 2 -3, p. 360 – 378, 1998.

ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current opinion in neurobiology**, n. 11, p. 180 – 187, 2001.

ABRAHAMMS, S.; et al. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. **Neuropsychologia**, v.35, p.11 – 24, 1997.

ALBENSI, B.C. Models of brain injury and alterations in synaptic plasticity. **Journal of neuroscience research**, v.65, n. 4, 2001.

ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Current opinion in neurobiology**, n.10, p. 612 – 624, 2000.

ANDERSON, W.R. Na,K-ATPase is decreased in hippocampus of kainate-lesioned rats. **Epilepsy research**, v. 3, n. 17, p. 221 – 231, 1994.

ANSARI, M.A.; et al. Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. **Biological trace element Research**, v. 1, n. 101, p 73 – 86, 2004.

ANSARI, M.A.; et al. In vivo administration of D609 leads to protection of subsequently isolated gerbil brain mitochondria subjected to in vitro oxidative stress induced by amyloid beta-peptide and other oxidative stressors: relevance to Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Free radical biology and medicine**, v. 11, n. 41, p. 1694 – 1703, 2006.

ANSARI, M.A.; ROBERTS, K.N.; SCHEFF, S.W. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. **Free radical biology and medicine**, v. 4, n. 45, p. 443 – 452, 2008.

ARIDA, R.M.; et al. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Research**, n. 37, p. 45 – 52, 1999.

ARMSTEAD, W.M. Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction

after brain injury. **European journal of pharmacology**, v. 1-3, n. 529, p. 129 – 135, 2006.

BAGH MB; et al. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 6, n. 42, p. 574 – 581, 2008.

BANERJEE, A.K. et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molecular and cellular biochemistry**, v, 1-2, n. 253, p. 307 – 312, 2003.

BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, n. 93, p. 74 – 104, 1979.

BEAL, M.F. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **Annals of New York academy of science**, n. 991, p. 120 – 131, 2003.

BEAR, M.F.; BARRY, W.C.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Artmed Editora S.A., 2006.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. **Methods in enzymology**, n. 264, p. 442 – 453, 1996.

BEGHI, E. Overview of studies to prevent posttraumatic epilepsy. **Epilepsia**, n. 44, p. 21 – 26, 2003.

BÉGUIN, P.; et al. The gamma subunit is a specific component of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and modulates its transport function. **EMBO Journal**, v. 14, n. 16, p. 4250 – 4260, 1997.

BEJMA, J.; JI, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 1, n. 87, p. 465 – 470, 1999.

BELLISSIMO MI.; et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 2, n. 46, p. 121 – 128, 2001.



BENTZER, P.; DAVIDSSON, H.; GRANDE, P.O. Microdialysis-based long-term measurements of energy-related metabolites in the rat brain following a fluid percussion trauma, **Journal of neurotrauma**, n. 17, p.441 – 447, 2000.

BERTORELLO, A.M.; et al. Isoproterenol increases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by membrane insertion of alpha-subunits in lung alveolar cells, **American journal of Physiology**. N. 276, p. 20 – 27, 1999.

BOHANNON, R.W. Physical rehabilitatin in neurologic diseases. **Current opinion in neurology**, n. 6, p. 765 – 772, 1993.

BONDANELLI, M.; et al. Hypopituitarism after traumatic brain injury. **European journal of endocrinology**, v. 5, n. 152, p. 679 – 691, 2005.

BOLDYREV, A.A.; et al. The effect of hydrogen peroxide and hypochlorite on brain Na,K-ATPase activity. **Biokhimiia**, v. 10, n. 60, p. 1688 – 1696, 1995.

BOOTH FW, LEES SJ. Physically active subjects should be the control group. **Medicine and science in sports exercise**, v.3, n. 38, p. 405 – 406, 2006.

BORTZ, W.M. 2nd; et al. Catecholamines, dopamine, and endorphin levels during extreme exercise. **New england journal of medicine**, v. 8., n. 305, p. 466 – 467, 1981.

BOUMA, G.J.; et al. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. **Journal of Neurosurgery**, v. 3, n. 77, p. 360 – 368, 1992.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. **IUBMB Life**, n. 60, p. 308 – 314, 2008.

BRAMLETT, H.M.; DIETRICH, W.D. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. **Journal of cerebral blood flow metabolism**, v. 2, n. 24, p. 133 – 135, 2004.

BRASTED, P.J.; BUSSEY, T.J.; MURRAY, S.P. Role of the hippocampal system in associative learning beyond the spatial domain. **Brain**, v.126, p.1202 – 1223, 2003.

BRUNS, J. Jr.; HAUSER, W.A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. **Epilepsia**, n. 10, p. 2 – 10, 2003.

BULLOCK, R.; et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. **Journal of neurosurgery**, v. 4, n. 89, p. 507 – 518, 1998.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E.A.; O'KEEFE, J. The human hippocampus and partial and episodic memory. **Neuron**, v.35, p.625 – 641, 2002.

BURPEE, R.H.; STROLL, W. Measuring reaction time of athletes. **Res quart**, n. 7, p. 110 – 118, 1936.

CAHILL, L.; McGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in neurosciences**, n. 21, p. 294 – 299, 1998.

CAMMAROTA M; et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Brain research: Molecular Brain Research**, v. 1, n. 76, p. 36 – 46, 2000.

CANNING C.G.; et al. Exercise therapy for prevention of falls in people with Parkinson's disease: a protocol for a randomized controlled trial and economic evaluation. **BMC Neurology**, n. 9, p. 4, 2009.

CARNEY, J.M. Oxidative stress leading to loss of critical proteases in Alzheimer's disease. An alternative view of the etiology of AD. **Annals of New York academy of sciences**, n. 924, p. 160 – 163, 2000.

CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU, F.A. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comparative biochemistry and physiology part A, molecular and integrative physiology**, v. 4, n. 140, p. 409 – 413, 2005.

CHAE C.H.; KIM H.T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. **Neurochemistry international**, v. 4, n. 55, p. 208 – 213, 2009.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**, n. 59, p. 527 – 605, 1979.

CHEN, S.H.; et al. The effectiveness of computer-assisted cognitive rehabilitation for persons with traumatic brain injury. **Brain Injury**, v. 3, n. 11,, p. 197 – 209, 1997.

CHIBALIN, A.V.; et al. Dopamine-induced endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. **Journal of biology and chemistry**, v. 4, n. 274, p. 1920 – 1927, 1999.

CHOI, D.W. Ischemia-induced neuronal apoptosis. **Current opinion in neurobiology**, v. 5, n. 6, p. 667 – 672, 1996.

CHOU J.C.; LEE E.H. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. **Neuroscience**, v. 64, n. 1, p. 5 – 15, 1995.

CHOW, D.C.; FORTE, J.G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. **Journal of experimental biology**, n. 198, p. 1 – 17, 1995.

CLARK, R.S.; et al. Cerebrospinal fluid adenosine concentration and uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism after severe head injury in humans. **Neurosurgery**, v. 6, n. 41, p. 1284 – 1292, 1997.

CLARKSON, P.M. Antioxidants and physical performance. **Critical review of food and science in nutrition**, v. 1-2, n. 35, p. 131 – 141, 1995.

COHEN, A.S.; et al. Injury-induced alterations in CNS electrophysiology. **Program in brain research**, n. 161, p. 143 – 169, 2007.

CORNELIUS, F. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted (Na-K)-ATPase. **Biochemical and Biophysical Acta**, n. 1071, p. 19 – 66, 1991.

COŞKUN, S.; et al. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. **Molecular and cellular biochemistry**, , v. 1-2, n. 280, p. 135 – 138, 2005.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neuroscience**, v. 6, n. 25, p. 295 – 301, 2002.

CRESPO, A.R.; et al. Increased serum sFas and TNFalpha following isolated severe head injury in males. **Brain Injury**, v. 4, n. 21, p. 441 – 447, 2007.

CUNNINGHAM, A.S.; et al. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. **Brain**, v. 8, n. 128, p. 1931 – 1942, 2005.

DADA, L.A.; et al. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. **Journal of clinical investigation**, v. 7 n. 111, p. 1057 – 1064, 2003.

DALLE-DONNE, I.; et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinical and chemical acta**, n. 329, p. 23 – 38, 2003.

DALMAZ, C.; NETTO, C. A. A memória. **Ciência e cultura**, n. 56, p. 30 – 31, 2004.

DeWITT, D.S.; PROUGH, D.S. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 20, p. 795 – 825, 2003.

DEAN, R.T.; et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical journal**, n. 324, p. 1 – 18, 1997.

DICKEY, C.A.; et al. Dysregulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. **BMC Neuroscience**, n. 2, p. 6 – 7, 2005.

DING, Y.; et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. **Neuroscience**, v. 3, n. 124, p. 583 – 591, 2004.

DIRINGER. M.N.; et al. No reduction in cerebral metabolism as a result of early moderate hyperventilation following severe traumatic brain injury. **Journal of Neurosurgery**, v. 1, n. 92, p. 7 – 13, 2000.

DOBROTA, D.; et al. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. **Cellular and molecular neurobiology**, n. 19, p. 141 – 149, 1999.

DONOVAN, C.M.; PAGLIASSOTTI, M.J. Quantitative assessment of pathways for lactate disposal in skeletal muscle fiber types. **Medicine and science in sports and exercise**. V. 4, n. 32, p. 772 – 777, 2000.

Del MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand Suppl**, n. 492, p. 153 – 168, 1980.

DURING, M.J.; CAO, L. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. **Current Alzheimer research**, v. 1, n. 3, p. 29 – 33, 2006.

EINCHENBAUM, H. **The Cognitive Neuroscience of Memory: an Introduction**. Oxford University Press, 2002.

ELDADAH, B.A.; FADEN, A.I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 10, n. 17, p. 811 – 829, 2000.

ENEVOLDSEN, E.M.; JENSEN, F.T. Autoregulation and CO<sub>2</sub> responses of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury. **Journal of neurosurg**, v. 5, n. 48, p. 689 – 703, 1978.

ESTERBAUER, H.; et al. Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. **Biochimical and biophysical Acta**, v. 1, n. 876, p. 154 – 166, 1986.

FABEL, K.; et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis **European journal of neuroscience**, v. 10, n. 18, p. 2803 – 2812, 2003.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da associação médica brasileira**, v. 1, n. 43, p. 61 – 68, 1997.

FIGHERA, M.R.; et al. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **International journal of biochemical and cellular biology**, v. 4, n. 35, p. 465 – 473, 2003.

FINFER, S.R; COHEN, J. Severe traumatic brain injury. **Resuscitation**, v. 1, n. 48, p. 77 – 90, 2001.

FISHER, A.B. intracellular production of oxygen-derived free radicals. **Proceedings of a brook lodge Symposium**, Augusta p. 17 – 29, 99 – 104, 1987.

FISHER, K.A.; BINDER, H.J.; HAYSLETT, J.P. Potassium secretion by colonic mucosal cells after potassium adaptation. **American journal of physiology**, v. 4, n. 231, p. 987 – 994, 1976.

FLOYD, C.L.; GORIN, F.A.; LYETH, B.G. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cortical astrocytes. **Glia**, v. 1, n. 51, p. 35 – 46, 2005.

FORDYCE, D.E.; FARRAR, R.P. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. **Behavioural brain research**, v.2, n. 46, p. 123 – 133, 1991.

FORDYCE, D.E.; WEHNER, J.M. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Brain Research**, v. 1-2, n. 619, p. 111 – 119, 1993.

FORFIA, P.R.; et al. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. **Advanced experimental in medicine and biology**, n. 471, p. 381 – 388, 1999.

GHAJAR, J. Traumatic brain injury. **Lancet**, v. 9233, n. 356, p. 923 – 929, 2000.

GLADDEN, L.B. Muscle as a consumer of lactate. **Medicine and science in sports and exercise**. V. 4, n. 32, p. 764 – 771, 2000.

GLENN, T.C.; et al. Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism. **Journal of cerebral blood flow metabolism**, v. 10, n. 23, p. 1239 – 1250, 2003.

GOBATTO, C.A.; et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, n. 130, p. 21 – 27, 2001.

GODIN, D.V.; WOHAIEB, S.A. Nutritional deficiency, starvation and tissue antioxidant status. **Free Radicals in Biology and Medicine**. N. 5, p. 165 – 176, 1988.

GOPCEVIC, A.; et al. Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 4, n. 211, p. 387 – 393, 2007.

GREALY, .MA.; JOHNSON, D.A.; RUSHTON, S.K. Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. **Archives of physical medical rehabilitation**, v. 6, n. 80, p. 661 – 667, 1999.

GRIESBACH, G.S.; et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, v. 1, n. 125, p. 129 – 139, 2004a.

GRIESBACH, G.S.; GOMEZ-PINILLA, F.; HOVDA, D.A. The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise. **Brain research**, v. 2, n. 1016, p. 154 – 162, 2004b.

GRIESBACH, G.S.; GÓMEZ-PINILLA, F.; HOVDA, D.A. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. **Journal of Neurotrauma**, v. 7, n. 24, p. 1161 – 1171, 2007.

GRIESBACH, G.S.; HOVDA, D.A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Research**, 2009.

GRISAR, T. Glial and neuronal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in epilepsy. **Annals of neurology**, n. 16 Suppl, p. S128 – 134, 1984.

GRISHAM, M.B.; HERNANDEZ, L.A.; GRANGER, D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **American journal of physiology**, v. 4, n. 251, p. 567 – 574, 1986.

GUYNN, S.R.; SCOFIELD, M.A.; PETZEL, D.H. Identification of mRNA and protein expression of the Na/K-ATPase  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 and  $\alpha$ -3-subunit isoforms in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 273, p. 15 – 32, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana E Mecanismos Das Doenças**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1997.

HALL, E.D.; et al. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, v. 1, n. 21, p. 9 – 20, 2004.

HALLIWELL B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J**, v. 5, n. 1, p. 358 – 364, 1987.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American journal in clinical nutrition**, v.5, n. 57, p. 715S – 724, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press, New York, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, n. 186, p. 1 – 85, 1990.

HAN, D.; et al. **Handbook of antioxidants in exercise**. Elsevier, Amsterdam, p. 433 – 484, 2000.

HARMONY, T.; et al. (Na-K)-ATPase activity in experimental epileptogenic foci, **Brain Research**, v. 3, n. 11, p. 672 – 680, 1968.

HAUERBERG, J.; et al. The upper limit of cerebral blood flow autoregulation in acute intracranial hypertension. **Journal of neurosurgery and anesthesiology**, v. 2, n. 10, p. 106 – 112, 1998.

HEUNKS, L.M.A.; et al. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of physiology**, n. R1697 – 1704, 1999.

HIGUCHI, M.; et al. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. **Journal of gerontology**, v. 3, n. 40, p. 281 – 286, 1985.

HLATKY, R.; et al. Dynamic autoregulatory response after severe head injury. **Journal of neurosurgery**, v. 5, n. 97, p. 1054 – 1061, 2002.



HORISBERGER, J.D.; et al. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. **Ann. Rev. Physiol**, n. 53, p. 565 – 584, 1991.

HOVDA, D.A.; et al. Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study. **Brain Research**, n. 567, p. 1 – 10, 1991.

INCI, S.; OZCAN, O.E.; KILINÇ, K. Time-level relationship for lipid peroxidation and the protective effect of alpha-tocopherol in experimental mild and severe brain injury. **Neurosurgery**, v. 2, n. 43, p. 330 – 335, 1998.

INOUE, Y.; et al. Changes in cerebral blood flow from the acute to the chronic phase of severe head injury. **Journal of neurotrauma**, n. 22, p. 1411 – 1418, 2005.

ISAACS, K.R.; et al. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v.1, n.12, p. 110 – 119, 1992.

IZQUIERDO, I. **Arte de esquecer: cérebro, memória e esquecimento**. Vieira e Lent, 2004.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed Editora S.A., 2002.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 1, n.63, p. 19 – 32, 1995.

IZQUIERDO, I; et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, n. 393, p. 625 – 636, 1998.

JAEGER, M.; et al. Continuous assessment of cerebrovascular autoregulation after traumatic brain injury using brain tissue oxygen pressure reactivity. **Critical Care Medicine**, v. 6, n. 34, p. 1783 – 1788, 2006.

JAIN, K.K. Neuroprotection in traumatic brain injury. **Drug Discovery Today**, v. 23-24, n. 13, p. 1082 – 1089, 2008.

JAIN, S.K.; LIM, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity

reduction in high glucose-treated human erythrocytes. **Free Radical in biology and Medicine**, v. 3, n. 30, p. 232 – 237, 2001.

JAMME, I.; et al. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, n. 7, p. 333 – 337, 1995.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 3, n. 5, p. 156 – 170, 1988.

JI, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. **Exercise and sports science reviews**, n. 23, p. 135 – 166, 1995.

JI LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec;222(3):283-92.

JI, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 1, n. 263, p. 137 – 149, 1988.

JI, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of biochemistry and biophysics**. v. 1, n. 263, p. 150 – 160, 1988.

JI, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 3, n. 222, p. 283 – 292, 1999.

JOHNSTON, A.J.; et al. Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury. **Critical care medicine**, v. 1, n. 33, p. 189 – 195, 2005.

JØRGENSEN, P.L. Functional domains of Na,K-ATPase; conformational transitions in the alpha-subunit and ion occlusion. **Acta Physiologica scandinavica supplementum**, n. 607, p. 89 – 95, 1992.

JORGENSEN, P.L.; HÅKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Ann. Rev. Physiol**, n. 65, p. 817 – 849, 2003.

JOVICIĆ, M.E.; et al. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase in the rat. **Journal of Alzheimers disease**, v. 1, n.14, p. 85 – 93, 2008.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, n. 294, p. 1030 – 1038, 2001.

KAO, T.; et al. Exercise induces cortical plasticity after neonatal spinal cord injury in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 29, p. 7549 – 7557, 2009.

KAUR, J.; et al. Acetyl-L-carnitine enhances Na(+), K(+)-ATPase glutathione-S-transferase and multiple unit activity and reduces lipid peroxidation and lipofuscin concentration in aged rat brain regions. **Neuroscience letters**, v. 1, n. 301, p. 1 – 4, 2001.

KAWAKAMI, K.; et al. Primary structure of the  $\beta$ -subunit of *Torpedo californica* (Na-K) ATPase deduced from cDNA sequence. **Nature**, n. 316, p. 733 – 736, 1985.

KAWAKAMI, K.; NAGANO, K. The transmembrane segment of the human Na,K-ATPase  $\beta$ -subunit acts as the membrane incorporation signal. **Journal of biochemics**, v. 1, n. 103, p. 54 – 60, 1988.

KAWAKAMI, K.; et al. Modulation of neural activities by Na, K-ATPase  $\alpha$  2 subunit through functional coupling with transporters. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-grand)**, v. 8, n. 52, p. 92 – 96, 2006.

KESSELS, R.P.C.; et al. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Rev**, v.35, p.295- 303, 2001.

KONG, L.N.; et al. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. **Acta Pharmacol Sin**, v. 6, n. 26, p. 666 – 72, 2005.

KRAMER, A.F.; et al. Aging, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 6743, n. 400, p. 418 – 419, 1999.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Rev Nat**, n. 5, p. 282 – 294, 2004.

LAM, J.M.; HSIANG, J.N.; POON, W.S. Monitoring of autoregulation using laser Doppler flowmetry in patients with head injury. **Journal on neurosurgery**, v. 3, n. 86, p. 438 – 445, 1997.

LANG, E.W.; CZOSNYKA, M.; MEHDORN, H.M. Tissue oxygen reactivity and cerebral autoregulation after severe traumatic brain injury. **Critical care in medicine**, v. 1, n. 31, p. 267 – 271, 2003.

LANGLOIS, J. A.; et al. Traumatic brain injury-related hospital discharges. Results from a 14-state surveillance system, 1997. *MMWR Surveill Summ.* 2003 Jun 27;52(4):1-20

LAWTER, J.D. **Psychology of coaching**. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, New Jersey, 1951.

LEE, J.M.; et al. Hemodynamically significant cerebral vasospasm and outcome after a head injury: a prospective study. **Journal of neurosurgery**, n. 87, p. 221 – 233, 1997.

LEE, E.; SON H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. **BMB Report**, v. 5, n. 42, p. 239 – 244, 2009.

LEES, G.; JONES, E.G. Expressive gene record memories. **Neurobiology of disease**, n.7, p. 533 – 536, 2000.

LEES, G.J.; et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, n. 120, p. 159 – 162, 1990.

LEEUWENBURGH, C.; et al. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **American journal of physiology**, v. 1 Pt 2, n. 272, p. R363 – 369, 1997.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Editora Sarvier, São Paulo, 2006.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

LEVINE, R.L.; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, n. 186, p. 464 – 478, 1990.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. **Journal of psychology and neural**, n. 46, p. 113 – 174, 1934.

LOWNDES, J.M.; HOKIN-NEAVERSON, M.; RUOHO, R.J. Photoaffinity labeling of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase with [125I] iodoazidocymarin. **J. Biol. Chem**, n. 193, p. 265 – 275, 1951.

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

MAHADIK, S.P.; MUKHERJEE, S Cultured skin fibroblasts as a cell model for investigating schizophrenia. **Journal of psychiatric research**, v.6, n. 30, p. 421 – 439, 1996.

MALFATTI CR, et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. **Epilepsia**, V. 6, n. 44, p. 761 – 767, 2003.

MARCIN, J.P.; POLLACK, M.M. Triage scoring systems, severity of illness measures, and mortality prediction models in pediatric trauma. **Critical care in medicine**, v. 11 Suppl, n. 30, p. S457 – 467, 2002.

MARMAROU, A.; et al. Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. **Journal of neurosurgery**, v. 2, n. 93, p. 183 – 193, 2000.

MARMAROU, A.; et al. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. **Journal of neurosurgery**, v. 5, n. 104, p. 720 – 730, 2006.

MARMAROU, C.R.; et al. Quantitative analysis of the relationship between intra-axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, n. 22, p. 1066 – 1080, 2005.

MARSHALL, L.F. Head injury: recent past, present, and future. **Neurosurgery**, v. 3, n. 47, p. 546 – 561, 2000.

MATSON, M.P. energy intake, meal frequency and health: a neurobiological perspective. **Annu rev nutrition**, n. 27, p. 237 – 260, 2005.

MATSON, M.P.; WAN, R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular system. **Journal of nutrition biochemistry**, n. 16, p. 129 – 137, 2005.

MATSON, M.P.; MAGNUS, P. Ageing and neuronal vulnerability. **Nat rev neuroscience**, n. 7, p. 278 – 294, 2006.

MAYFORD, M.; KANDEL, E.R. Genetic approaches to memory storage. **Journal of physiology**, n. 394, p. 501 – 527, 1987.

McAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdale: a system perspective. **Trends in neurosciences**, n. 25, p. 456 – 461, 2002.

McAULEY, E.; RUDOLPH, D. Physical activity, aging and psychological, well-being. **Journal of aging and psychology acta**, n. 3, p. 67 – 96, 1995.

McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **New england journal of medicine**, v. 3, n.312, p. 159 – 163, 1985.

McGAUGH, J.L. Memory – a century of consolidation. **Science**, n. 287, p. 248 – 251, 2000.

McGAUGH, J.L.; IZQUIERDO, I. The contributions of pharmacology on the mechanisms of memory formation. **Trends in pharmacological sciences**, n. 21, p. 208 – 210, 2000.

MCLAUGHLIN, M.R.; MARION, D.W. Cerebral blood flow and vasoresponsivity within and around cerebral contusions. **Journal of neurosurgery**, v. 5, n. 85, p. 871 – 876, 1996.

MEERSON, F.Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P. et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of isquemia damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Research Cardiology**, v. 77, p. 465-485, 1982.

MENEGHINI, R.; et al. DNA damage during the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of isobutanol. **Biochemical and biophysical acta**, v. 29 n. 518, p. 177 – 180, 1978.

MEYDANI, M.; EVANS, W.J. **Free radicals, exercise and aging**. Ed Free radicals in Aging. Boca Raton, FI: CRC Press, p. 183 – 204, 1993.

MOREL, P.; et al. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat striatal synaptosomes, **Neurochemistry international**, n. 33, p. 531 – 540, 1998.

MORRIS, R.G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **Journal of neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 3040 – 3057, 1989.

MOSELEY, A.E.; et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **Journal of neuroscience**, n. 27, p. 616 – 626, 2007.

MUSSACK, T.; et al. Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. **Critical care medicine**, v.12, n. 30, p. 2669 – 2674, 2002.

NATHANSON, J.A. The cellular Na<sup>+</sup> pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron**, v. 4, n. 14, p. 781 – 794, 1995.

NARAYAN, R.K.; et al. Clinical trials in head injury, **Journal of neurotrauma**, n. 19, p. 503 – 557, 2002.

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

NORTJE, J.; MENON, D.K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Current opinion in neurology**, v. 6, n. 17, p. 711 – 718, 2004.

O'NEILL, C.A.; et al.; Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. **Journal of applied physiology**, v. 3, n. 81, p. 1197 – 1206, 1996.

OERTEL, M.; et al. Posttraumatic vasospasm: the epidemiology, severity, and time course of an underestimated phenomenon: a prospective study performed in 299 patients. **Journal of neurosurgery**, v. 5, n. 103, p. 812 – 824, 2005.

OGONOVSKY, H.; et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Can J Appl Physiol**. 2005 Apr;30(2):186-95.

OH-ISHI, S., et al. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. **Clinical and experimental pharmacology physiology**, v. 5, n. 24, p. 326 – 332, 1997.

OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space and memory. **The behavioural and brain science**. V.2, p 313 – 365, 1979.

OPII, W.O.; et al. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, n. 24, p. 772 – 789, 2007.

OVERGAARD, J.; TWEED, W.A. Cerebral circulation after head injury. Part 4: Functional anatomy and boundary-zone flow deprivation in the first week of traumatic coma. **Journal of neurosurgery**, v. 3, n, 59, p. 439 – 446, 1983.

PACKER, L.; CADENAS, E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radical Research*, n. 41, p. 951 – 952, 2007.

PACKER, L.; CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Free radicals and exercise: an introduction. **Free Radical Biol Med**, n. 44, p. 123 – 125, 2008.

PAKSINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**. 2<sup>o</sup> edition. New York Academic press. 1986.

PAL YU, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology reviews**, 1994.

PALMER, A.M.; et al. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. **Journal of Neurochemistry**, v. 6, n. 61, p. 2015 - 2024, 1993.

PATZ, S.; WAHLE P. Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. **The European journal of neuroscience**, v. 3, n. 20, 2004.

PÉREZ, C.A.; CANCELA CARRAL, J.M. Benefits of physical exercise for older adults with Alzheimer's disease. **GERIATRIC NURSING**, v. 6, n. 29, p. 384 – 391, 2008.

PIERRE, S. et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. **Neuroreport**, v. 1, n. 10, p. 47 – 51, 1999.



PIERSON, W.R.; MONTOYE, H.J. Movement time, reaction time and age. **Journal of gerontology**, n. 13, p. 418 – 421, 1958.

PINEDA JA, WANG KK, HAYES RL. Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. **Brain Pathol.** 2004 Apr;14(2):202-9.

POTHAKOS K.; KURZ M.J.; LAU Y.S. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. **BMC Neuroscience**, n. 9, p. 10, 2009.

POTTS, M.B.; et al. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. **NeuroRx**, n. 3, p. 143 – 153, 2006.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3ª edição, Editora Manole, São Paulo, 2000.

PRATICÒ, D.; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **American journal of medicine**, v. 7, n. 109, p. 577 – 585, 2000.

PRYOR, W. A.; et al. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 293 – 239, 1984.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. Oxford, University Press, New York, 1996.

PUNTARULO, S.; et al. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 2, n. 372, p. 355 – 359, 1999.

QUINTANILHA, A.T. Effects of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. **Biochemical society transaction**, v. 3, n. 12, p. 403 – 404, 1984.

RADAK, Z.. et al. Acute bout of exercise does not alter the antioxidant enzyme status and lipid peroxidation of rat hippocampus and cerebellum. **Pathophysiology**, n. 2, p. 243 – 245, 1995a.

RADAK, Z.; et al. superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **Journal of applied physiology**. n. 79, p. 129 – 135, 1995b.

RADAK, Z.; et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem. International**, n. 38, p.17 – 23, 2001.

RADAK, Z.; et al. Adaptation to exercise induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc. Immunol Review**, n. 7, p. 90 – 107, 2001.

RADAK, Z.; et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 4, n. 49, p. 387 – 392, 2006.

RADAK, Z.; et al. Exercise, oxidative stress and hormesis. **Ageing Res Rev**. v. 1, n. 7, p. 34 – 42, 2008.

RADI, R.; et al. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys**, v. 1, n. 308, p. 89 – 95, 1994.

RAMBO, L.M.; et al Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochemistry international**, v. 5, n. 55, p. 333 – 340, 2009.

RAZA, M.; et al. Aging is associated with elevated intracellular calcium levels and altered calcium homeostatic mechanisms in hippocampal neurons. **Neuroscience letters**, v. 1, n. 418, p. 77 – 81, 2007.

REID, M. B.; et al.; N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. **Journal of clinical investigation**, v. 6, n. 94, p. 2468 – 2474, 1994.

RINALDI, A.; CONTI, L. Posttraumatic epilepsy. **Neurol Sci**, v. 4, n. 24, p. 229 – 230, 2003.

RICE, W.J.; et al. Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E1 and E2 states. **Biophysical journal**, v. 5, n. 80, p. 2187 – 2197, 2001.

RIOBO, N.A.; et al. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. **J Biol Chem**, v. 45, n. 277, p. 42447 – 42455, 2002.

ROBERTSON, C.S.; et al. Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: associatin with severity of injury and excitotoxicity. **Critical care in medicine**, n. 29, p. 2287 – 3393, 2001.

ROSE, A.M.; VALDES, R. Jr. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. **Clinical chemistry**, v. 9, n. 40, p. 1674 – 1685, 1994.

ROSS, S.T.; SOLTESZ, I. Selective depolarization of interneurons in the early posttraumatic dentate gyrus: involvement of the Na(+)/K(+)-ATPase, **J Neurophysiology**, n. 83, p. 2916 – 2930, 2000.

ROTHMAN, M.S.; et al. The neuroendocrine effects of traumatic brain injury. **Journal of neuropsychiatry and clinical neuroscience**, v. 4, n. 19, p. 363 – 372, 2007.

ROYES, L.F.; et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 4, n. 118, p. 1079 – 1090, 2003.

ROYO, N.C.; et al. Neurotrophin-mediated neuroprotection of hippocampal neurons following traumatic brain injury is not associated with acute recovery of hippocampal function, **Neuroscience**, n. 148, p. 359 – 370, 2007.

RUBIN, M.A.; et al. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural pharmacology**, v.1, n. 11, p. 57 – 61, 2000.

SAKELLARIS, G.; et al. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **Journal of trauma**, n. 61, p. 322 – 329, 2006.

SALMOND, C.H.; SAHAKIAN, B.J. Cognitive outcome in traumatic brain injury survivors. **Current opinion on critical care**, n. 11, p. 111 – 116, 2005.

SAMORAJSKI, T.; et al. Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice. **Neurobiology of aging**, v. 1, n. 6, p. 17 – 24, 1985.

SCHMIDT, E.A.; et al. Asymmetry of pressure autoregulation after traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, v. 6, n. 99, p. 991 – 998, 2003.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. **Applied physiology**, v. 3, n. 79, p. 675 – 686, 1995.

SHAO, C.; et al. Oxidative stress in head trauma in aging, **Free Radic Biol Med**, n. 41, p. 77 – 85, 2006.

SCHWARZBACH, E.; et al. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. **Hippocampus**, v. 6, n. 16, p. 541 – 550, 2006.

SINGH, I.N.; et al. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. **Journal of cerebral blood flow metabolism**, n. 26, p. 1407 – 1418, 2006.

SJÖDIN B, HELLSTEN WESTING Y, APPLE FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 4, n. 10, p. 236 – 254, 1990.

SKOU, J.C. The Na,K-pump. **Methods in enzymology**, n.156, p. 1 – 25, 1988.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v.222, p.1-15, 1984.

SMITH A.D.; ZIGMOND M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Experimental Neurology**, v.1, n.184, p. 31 – 39, 2003.

SOBEY, C.G. Cerebrovascular dysfunction after subarachnoid haemorrhage: novel mechanisms and directions for therapy. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 11, n. 28, p. 926 – 929, 2001.

SOMANI, S.M.; et al. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. **Pharmacology and biochemistry research**, n. 50, p. 635 – 639, 1995.

SOUSTIEL, J.F.; SVIRI, G.E. Monitoring of cerebral metabolism: non-ischemic impairment of oxidative metabolism following severe traumatic brain injury. **Neurological research**. n. 29, p. 654 – 660, 2007.

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

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc**, v. 4, n. 63, p. 390 – 408, 1988.

SOUZA, M.A.; et al. Swimming training prevents pentylene-tetrazol-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 4, n. 50, p. 811 – 823, 2009.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **MEMÓRIA: DA MENTE ÀS MOLECULAS**. Artmed Editora AS, Porto Alegre, 2003.

SRINIVASAN, V.; et al. Role of melatonin on neurodegenerative diseases. **Neurotox Research**, v. 4, n. 7, p. 293 – 318, 2005.

STAHL, W.L.; HARRIS, W.E. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Advanced Neurology**, n. 44, p. 681 – 693, 1986.

STAHL, N.; UNGERSTEDT, U.; NORDSTROM, C.H. Brain energy metabolism during controlled reduction of cerebral perfusion pressure in severe head injuries. **Intensive Care Medicine**, n. 27, p. 1215 – 1223, 2001.

STIEFEL, M.F.; TOMITA, Y.; MARMAROU, A. Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, v. 4, n. 103, p. 707 – 714, 2005.

STIEFEL, M.F.; et al. Conventional neurocritical care and cerebral oxygenation after traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, v. 4, n. 105, p. 568 – 575, 2006.

STRYER, L. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

STRÜDER, H.K.; WEICKER, H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. **International journal of sports medicine**, v. 7, n. 22, p. 467 – 481, 2001.

STRÜDER, H.K.; WEICKER, H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part II. **International journal of sports medicine**, v. 7, n. 22, p. 482 – 497, 2001.

STUMMER, W.; et al. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. **Stroke**, n. 25, p. 1862 – 1869, 1994.

STUMMER, W.; et al. Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbil. Underlying mechanisms of brain ion homeostasis during acute and chronic variations of plasma potassium. **Stroke**, n. 26, p. 1423 – 1429, 1995.

SWEADNER, K.J.; DONNET, C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca<sup>2+</sup> - ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Biochemical journal**, n. 356, p. 685 – 704, 2001.

TAVAZZI, B.; et al. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. **Neurosurgery**, v. 3, n. 56, p. 582 – 589, 2005.

TILLERSON, J.L.; et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, n. 119, p. 899 – 911, 2003.

TODO, H.; et al. Impairment in biochemical level of arterial dilative capability of a cyclic nucleotides-dependent pathway by induced vasospasm in the canine basilar artery. **Journal of cereb blood flow and metabolism**, v. 7, n. 18, p. 808 – 817, 1998.

TOLDY, A.; et al. The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. **Brain research bulletin**, n. 65, p. 487 – 493, 2005.

TOLIAS, C.M.; BULLOCK, M.R. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? **NeuroRx**, n. 1, p. 71 – 79, 2004.

TONKIKH, A.; et al. Calcium chelation improves spatial learning and synaptic plasticity in aged rats. **Experimental neurology**, v. 2, n. 197, p. 291 – 300, 2006.

TORRES, M.; FORMAN, H.J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors**, v. 1-4, n. 17, p. 287 – 296, 2003 .

TOWNSEND, K.P.; PRATICÒ, D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal**, v. 12, n. 19, p. 1592 – 1601, 2005.

TYLER, W.J.; POZZO-MILLER, L.D. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. **Journal of neuroscience**, v.12, n. 15, p. 4249 – 4258, 2001b.

TYLER, W.J.; et al. BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. **Journal of physiology**, v. Pt 3, n. 574, p. 787 – 803, 2006.

TYURIN, V.A.; et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. **Journal of neurochemistry**, v. 5, n. 75, p. 2178 – 2189, 2000.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 1-2, n. 189, p. 41 – 54, 2003.

US Department of Health and Human Services. Healthy people 2010 [on line] <http://www.healthypeople.gov/document>, 2000.

UNTERBERG, A.W.; et al. Edema and brain trauma. **Neuroscience**, V. 4, N. 129, P. 1021 – 1029, 2004.

Van PRAAG, H.; et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of sciences U S A**, v. 23, n. 96, p. 13427 – 13431, 1999.

VAYNMAN, S.S.; et al. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain Research**, v. 1, n. 1070, p. 124 – 130, 2006.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. Revenge of the "sit": how lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity. **Journal of neuroscience research**, v. 4, n. 84, p. 699 – 715, 2006.

VAYNMAN S.; YING Z.; GOMEZ-PINILLA F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European journal of neuroscience**, v. 10, n. 20, p. 2580 – 2590, 2004.

VERWEIJ, B.H.; et al. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. **Journal of neurosurgery**, v. 5, n. 93, p. 815 – 820, 2000.

VINK, R.; GOLDING, E.M.; HEADRICK, J.P. Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats. **Journal of neurotrauma**, n. 11, p. 265 – 274, 1994.

VITALE, A.E.; et al. Screening of health risk factors prior to exercise or a fitness evaluation of adults with traumatic brain injury: a consensus by rehabilitation professionals. **Brain Injury**, v. 5, n. 10, p. 367 – 675, 1996.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian journal of medical and biology research**, v. 11, n. 35, p. 1389 – 1394, 2002.

WALKER, P.M.; et al. Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. **Journal of vascular surgery**, v. 1, n. 5, p. 68 – 75, 1987.

WANG, R.Y.; YANG, Y.R.; YU, S.M. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. **Brain Research**, n. 922, p. 140 – 143, 2001.

WANNAMETHEE, G.; SHAPER, A.G. Physical activity and stroke in British middle aged men. **Bmj**, n. 304, p. 597 – 601, 1992.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **British journal of Anaesthesia**, v. 1, n. 99, p. 4 – 9, 2007.

WERNIS, S.W.; LUCCHESI, B.R. Free radicals and ischemic tissue injury. **Trends in pharmacology science**, v. 4, n. 11, p. 161 – 166, 1990.

WU, H.M.; et al. Selective metabolic reduction in gray matter acutely following human traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, v. 2, n. 21, p. 149 – 161, 2004.



YI, J-H.; HAZELL, A.S. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochemistry International**, n. 48, p. 394 – 403, 2006.

YILMAZ, G.; et al. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. **Tohoku J Exp Med**, n. 211, p. 23 – 30, 2007.

YING, Z.; et al. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. **Brain research**, v. 1, n. 987, p. 93 – 99, 2003.

YING Z.; et al. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 2, n. 193, p. 411 – 419, 2005.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Reviews**. N. 74, p. 139 – 162, 1994.

YU, S.P. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochemical Pharmacol**, n. 66, p. 1601 – 1609, 2003.

ZHAN, H.; et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. **Neurological research**, n. 26, p. 35 – 40, 2004.

ZHANG, Z.; et al. Early infiltration of CD8<sup>+</sup> macrophages/microglia to lesions of rat traumatic brain injury. **Neuroscience**, v. 1, n. 141, p. 637 – 344, 2006.

ZINK, B.J. Traumatic brain injury outcome: concepts for emergency care. **Ann Emerg Med**, v. 3, n. 37, p. 318 – 332, 2001.

ZUCCARELLO, M.; et al. Endothelin B receptor antagonists attenuate subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. **Stroke**, v. 9, n. 29, p. 1924 – 1929, 1998.