

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Afonso Kopczynski de Carvalho

**Sinalização Neurotrófica e Bioenergética Mitocondrial: substratos de reserva cerebral
contra o traumatismo cranioencefálico**

Porto Alegre, RS

2023

Afonso Kopczynski de Carvalho

**Sinalização Neurotrófica e Bioenergética Mitocondrial: substratos de reserva cerebral
contra o traumatismo cranioencefálico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela.

Porto Alegre, RS

2023

CIP - Catalogação na Publicação

DE CARVALHO, AFONSO

Sinalização Neurotrófica e Bioenergética
Mitocondrial: substratos de reserva cerebral contra o
traumatismo cranioencefálico / AFONSO DE CARVALHO. --
2023.

120 f.

Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Volume de exercício. 2. Reservas cerebrais
induzidas pelo exercício. 3. BDNF. 4. Bioenergética
mitocondrial. 5. Trauma crânio encefálico. I. Valmor
Cruz Portela, Luis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O sonho das pessoas nunca morrerá! Existem três coisas que não podem ser interrompidas: o sonho das pessoas, o fluxo do tempo e o conhecimento herdado,”

Gol D Roger

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer a meus à família, meus irmãos em especial à Bárbara, Marcinha e Marcelo foram sempre muito presentes e solícitos para me ajudar sempre que necessário. Todos sempre dispostos a escutarem, entenderem o que eu estou fazendo e a conversarem comigo sobre as possibilidades que surgem. Quero também agradecer aos meus sobrinhos Alexandre, Davi e Guilherme, vocês sempre são um dos motivos de continuar tentando buscar coisas novas e me esforçar mais para continuar sendo alguém que vocês admirem.

Quero agradecer ao meu pai e minha mãe por todo o amor e inspiração que vocês me dão. Vocês são uma grande esperança para eu ver que quando eu envelhecer posso continuar me divertindo, aprendendo e sendo feliz, porque sempre podemos buscar por mais felicidade. Pai muito obrigado por ser um anjo para mim, uma pessoa compreensiva ao extremo, meu maior fã, saiba que a recíproca é verdadeira, você é meu herói!

Gostaria de agradecer ao pessoal da secretaria por todo o apoio que vocês dão para que possamos nos focar inteiramente nos nossos projetos, agradecer por toda a velocidade a que atendem a tudo que lhes é pedido. Em especial gostaria de agradecer a Cléia por sempre realizar seu trabalho da maneira mais eficiente e com um grande sorriso no rosto, sempre sendo uma pessoa calorosa. Obrigado Giordano, apenas te colocar como alguém da secretaria seria pouco! Obrigado por todo seu apoio, pelos churrascos, bebidas e conversas, você foi muito importante para esse momento. À banca examinadora a professora Raquel, o professor André e a professora Maria Rosa. Obrigado pelo tempo disponibilizado para ler esse trabalho, seus comentários com certeza me ajudarão a melhorar ainda mais na ciência.

Agradeço imensamente ao Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, aqui foi onde me encontrei, onde descobri uma paixão que eu não sabia que eu tinha, onde estou há quase uma década! Nosso ambiente sempre foi um dos principais motivos de eu amar e querer continuar na ciência, muito obrigado. Muitas pessoas passaram durante esse tempo e me ensinaram muito. Também às “meninas” da Lisi e a professora Lisiane que dividem o laboratório com nós, muito obrigado. Agradeço aos meus colegas de laboratório Jijo, Gabriela (mais recentemente) e em especial a Vitória que ajudou em diversos momentos com conversas e apoio técnico. Preciso agradecer mais especificamente a dois grandes amigos que o laboratório me deu para a vida, Marcelo e Nathan por estarem dispostos e disponíveis para experimentos, conversas, discussões científicas e sobre vida, obrigado por todos os momentos de reflexões e dicas que vocês me dão.

Gostaria de agradecer a família da minha esposa porque entraram na minha vida recentemente e me receberam muito bem, obrigado seu Airton, dona Maria e meus cunhados Leticia e Felipe.

Muito obrigado também a família do meu orientador, família Portela, vocês a muitos anos me tratam muito bem e com muita naturalidade, essa dissertação foi feita principalmente durante a pandemia e com isso diminuimos muito as vezes que nos vimos, porém sempre que tive o prazer de vê-los foi incrível. Em especial a Isabela e a Elsa, muito obrigado a vocês. Professor Roska, essa relação pra mim já foi muito além de mentor e mentorado, você é uma inspiração de tantas maneiras que às vezes acho que você não sabe! Muito obrigado e esse obrigado e para tantas coisas que fica difícil de elencar, no mesmo nível que tu me faz sonhar você também me trás para a realidade quando eu simplesmente perco o controle. Eu sempre vou te lembrar que por mais que você goste de ser um pesquisador famoso que ninguém

conhece que mais perde com isso é o mundo por não te conhecer e não na ciência mas como ser humano, eu te admiro e te agradeço sempre!

Por último a pessoa que me mudou, entrou no meu mundo antes de começar essa dissertação e me conquistou e me ensinou de tantas maneiras que não sei descrever. Obrigado meu amor que não se tornou apenas minha esposa nesse período mas se tornou em uma grande amiga inspiradora. Você me impulsiona e motiva a querer mais e a conquistar mais, você foi crucial para esse trabalho ser finalizado e mais. Obrigado por tudo, obrigado por ser você e obrigado por como você me faz ser. Eu te amo!

Lista de Figuras

Figura 1 – Causas de TCE.....	17
Figura 2 – Epidemiologia do TCE.....	19
Figura 3 – Fluxograma dos mecanismos fisiopatológicos.....	21
Figura 4 – Desestruturação axonal.....	22
Figura 5 – Dano mitocondrial.....	24
Figura 6 – Sinalização BDNF.....	34
Figura 7 - Resumo Gráfico.....	104

Lista de Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CA	Campo Aberto
CCI	Controlled Cortical Impact
CX	Córtex
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECGI	Escala de Coma de Glasgow
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EIM	Espaço Intermembranas
ERO	Espécies Reativas de oxigênio
ETS	Electron Transport System
FDA	Food and Drug Administration
HC	Hipocampo
HT	Hipotálamo
HV	Alto volume/ Higher volume
ICC	Impacto Cortical Controlado
LV	Baixo volume/ Lower Volume
MME	Membrana mitocondrial externa

MMI	Membrana mitocondrial interna
MWM	Morris water maze
NCLX	Mitochondrial sodium-calcium exchanger
OF	Open Field
OCR	Oxygen Consumption Ratio
SED	Sedentário/ Sedentary
STE	Sistema de Transporte de Elétrons
TCE	Traumatismo Crânio Encefálico

Índice

Capítulo I.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	15
1 Introdução.....	17
1.1 Trauma Crânio Encefálico.....	17
1.2 Mecanismos Fisiopatológicos.....	20
1.3 Tratamentos para o TBI.....	27
1.4 Reserva cognitiva.....	29
1.5 Exercício Físico.....	30
2 Objetivo.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	33
2.2.1 Protocolos de exercício físico.....	33
2.2.2 Indução de TCE.....	33
2.2.3 Parâmetros neuroquímicos neurotróficos.....	33
2.2.4 Avaliação mitocondrial.....	33
2.2.5 Avaliação perfil comportamental.....	33

Capítulo II.....	34
Capítulo III.....	94
Discussão.....	95
Figura Resumo.....	104
Conclusão.....	105
Perspectivas.....	106
Referências.....	107

Capítulo I

Resumo

A redução do suporte neurotrófico e o comprometimento da bioenergética mitocondrial são mecanismos centrais que contribuem para a neurodegeneração prolongada e o declínio cognitivo após traumatismo crânio encefálico (TCE). Nossa hipótese é que a pré-condicionamento com diferentes volumes de exercício físico, melhora o eixo *cAMP response element-binding protein* (CREB) e *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e a capacidade bioenergética mitocondrial. Esse aprimoramento poderia potencialmente servir como uma reserva neural contra deficiências cognitivas após um TCE grave. Em nosso estudo, utilizamos um sistema com uma roda de corrida colocada na gaiola para camundongos. Esses camundongos se envolveram em regimes de exercício de menor volume (LV, alternado 48 h roda livre e 48 h roda bloqueada) ou maior volume (HV, acesso livre a roda) por um período de trinta dias. Posteriormente, ambos os grupos LV e HV passaram mais trinta dias em suas gaiolas domésticas com a roda de corrida imobilizada antes de serem sacrificados. Em contraste, o grupo sedentário teve sua roda de corrida consistentemente trancada. Vale ressaltar que, para a mesma duração do exercício, os treinos diários representaram um volume total maior em comparação com o exercício em dias alternados. Para quantificar os diferentes volumes de exercício, usamos a distância total percorrida pelos camundongos durante o exercício voluntário como parâmetro de referência. Em média, o grupo de exercício LV correu aproximadamente 27.522 metros, enquanto o grupo de exercício HV percorreu cerca de 52.076 metros. Nossa investigação principal se concentrou em avaliar se ambos os protocolos de exercício LV e HV poderiam aumentar o suporte neurotrófico e bioenergético no hipocampo, mesmo trinta dias após o término do exercício. Independentemente do volume de exercício, ambos os regimes levaram a melhorias notáveis na sinalização hipocampal envolvendo pCREB Ser133, CREB-proBDNF e BDNF. Além

disso, esses regimes de exercício melhoraram a eficiência do acoplamento mitocondrial, a capacidade em excesso e o controle de vazamentos no hipocampo. Essas descobertas estabelecem a base neurobiológica para o conceito de reservas neurais. Para testar ainda mais a resiliência dessas reservas neurais, expusemos os camundongos a um TCE grave, trinta dias após suas rotinas de exercício. A taxa de mortalidade após TCE grave foi significativamente mais baixa nos grupos de exercício LV e HV (aproximadamente 20%) em comparação com o grupo sedentário (40%). Importante, os regimes de exercício, seja LV ou HV, mantiveram aprimorada a sinalização hipocampal e a funcionalidade mitocondrial mesmo diante de um TCE grave. Essas adaptações atenuaram os déficits de aprendizagem espacial e memória induzidos pelo TCE. Em resumo, o pré-condicionamento com regimes de exercício de menor e maior volume leva ao desenvolvimento de reservas neurais como CREB-BDNF e bioenergéticas de longa duração. Essas reservas desempenham um papel crucial na preservação da memória após um TCE grave, e proporcionam substratos neurobiológicos para prevenção de danos ao cérebro.

Palavras-chave: Volume de exercício, pré-condicionamento, reservas cerebrais induzidas pelo exercício, BDNF, bioenergética mitocondrial, traumatismo crânio encefálico, déficits de memória.

Abstract

Reducing neurotrophic support and impairing mitochondrial bioenergetics are central mechanisms contributing to prolonged neurodegeneration and cognitive decline following traumatic brain injury (TBI). Our hypothesis centers on the idea that preconditioning with varying volumes of physical exercise, both lower (LV) and higher (HV), can enhance the CREB-BDNF axis and bolster bioenergetic capacity. These enhancements could potentially serve as neural reserves, protecting brain against neurofunctional deficits subsequent to severe TBI. In our study, we employed a setup with a running wheel placed in the home cage. Mice were engaged in either lower-volume exercise (LV, 48 h free access, and 48 h locked) and higher (HV, daily free access) exercise volumes for a period of thirty days. Subsequently, both LV and HV groups spent an additional thirty days in their home cages with the running wheel immobilized before being euthanized. In contrast, the sedentary group had their running wheel always locked. It's worth noting that for the same duration of exercise, daily workouts represented a higher total volume compared to exercising on alternate days. To quantify the different exercise volumes, we used the total distance covered by the mice on the running wheel as a reference parameter. On average, the LV exercise group ran approximately 27.522 meters, while the HV exercise group covered about 52.076 meters. Our primary investigation revolved around assessing whether both LV and HV exercise protocols could increase neurotrophic and bioenergetic support within the hippocampus, even thirty days after exercise had ceased. Regardless of the exercise volume, both regimens led to notable enhancements in neurotrophic hippocampal signaling by pCREB^{Ser133}-CREB-proBDNF-BDNF axes. Additionally, LV and HV exercise regimens improved mitochondrial coupling efficiency, excess capacity, and leak control in the hippocampus. These findings lay the neurobiological

foundation for the concept of neural reserves. To further test the resilience of these neural reserves, we exposed the mice to a severe TBI, thirty days after their exercise routines. The mortality rate following TBI was notably lower in both the LV and HV exercise groups (approximately 20%) compared to the sedentary group (40%). Importantly, the exercise regimens, whether LV or HV, sustained the enhanced hippocampal signaling and mitochondrial bioenergetics endpoints when challenged by a severe TBI. These adaptations mitigated spatial learning and memory deficits induced by TBI. In summary, preconditioning with both LV and HV exercise regimens leads to the development of long-lasting CREB-BDNF and bioenergetic neural reserves against secondary TBI sequelae, and highlight these adaptations as neurobiological targets for preventive programs aiming brain health.

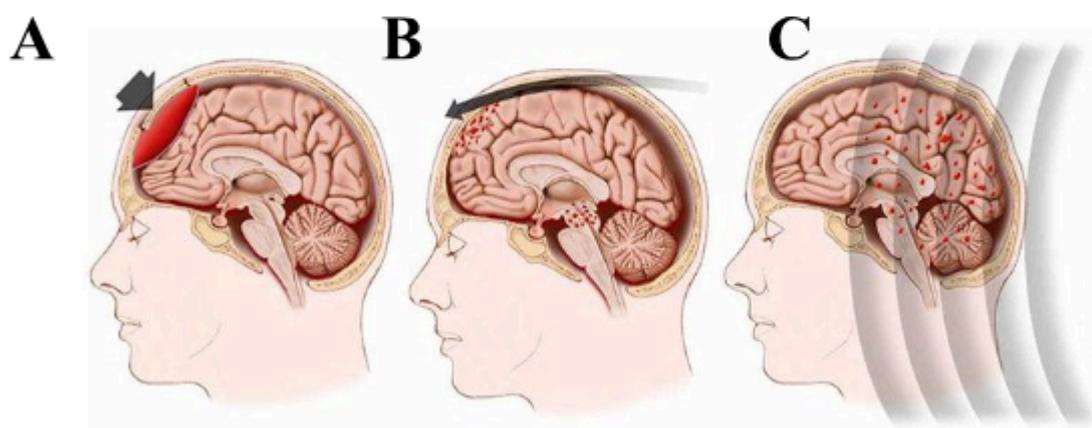
Keywords: Volume of exercise, preconditioning, exercise-induced brain reserves, CREB, BDNF, mitochondrial metabolism, traumatic brain injury, memory deficits.

1. Introdução

1.1 Trauma cranioencefálico

O Trauma cranioencefálico (TCE) é caracterizado alteração da função cerebral normal resultante da exposição a forças biomecânicas externas, cuja origem pode ser variada, incluindo impactos diretos na região craniana, mudanças súbitas na aceleração e desaceleração da cabeça (Figura 1), ou a propagação de ondas de choque originadas a partir de deslocamentos do ar. Estes tipos de trauma podem ou não resultar na penetração da estrutura craniana por objetos estranhos, manifestando-se, em alguns casos, apenas sob a forma de fraturas ou fissuras no crânio. As etiologias predominantes de TCE a nível global compreendem quedas, acidentes de trânsito, práticas esportivas, incidentes de natureza violenta, bem como a inserção de projéteis ou corpos estranhos no tecido encefálico.

Figura 1. Causas de TCE.

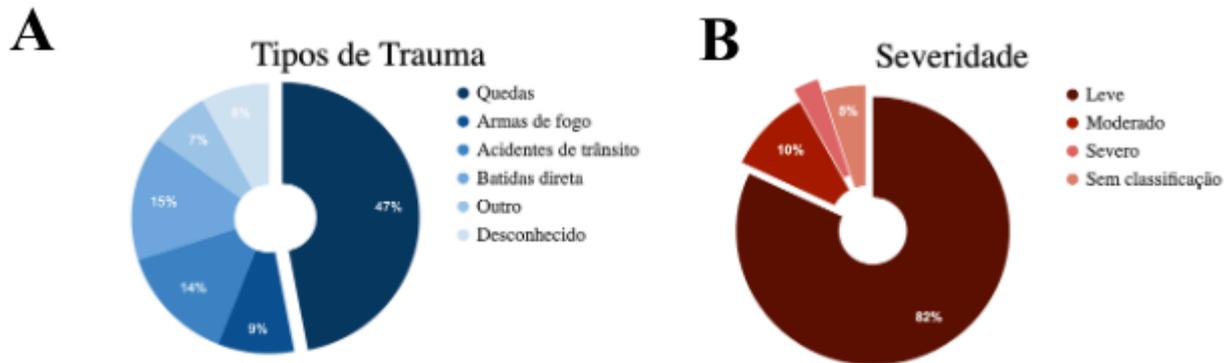


Fonte: Dawudo ST et all. Medscape. Aug 16. 2017. (A) Impacto direto, (B) Aceleração e desaceleração, (C) Ondas de Choque.

Clinicamente, o TCE é categorizado em três níveis distintos: leve, moderado e grave. A avaliação desse parâmetro neurológico é frequentemente realizada por meio da utilização da Escala de Coma de Glasgow (ECG), que desempenha um papel central na determinação do nível de consciência do paciente. Essa classificação resulta de uma análise ponderada de diversos critérios, nos quais, quando um paciente satisfaz os critérios em mais de uma categoria, prevalecerá a classificação mais elevada em termos de gravidade (Brasure et al., 2012). A utilização da Escala de Coma de Glasgow, com a consideração da pontuação mais favorável dentro das primeiras 24 horas, como o método qualitativo de maior recorrência. É importante salientar que, embora o nível de gravidade tenha relevância prognóstica, ele não necessariamente antecipa o desfecho funcional final do paciente.

Os desfechos associados ao TCE abrangem um espectro de impactos clínicos significativos, incluindo óbito prematuro, modificações cognitivas e neuropsiquiátricas, bem como sequelas físicas que podem frequentemente comprometer a qualidade de vida dos indivíduos sobreviventes (LEVIN; DIAZ-ARRASTIA, 2015; MEANEY; MORRISON; DALE BASS, 2014).

Figura 2. Epidemiologia do TCE.



Fonte: elaborada pelo autor. (A) Tipos de TCE. (B) Severidade do TCE. (Fonte: Schneider, C.M. 2019)

A incidência de Trauma Cranioencefálico (TCE) tem demonstrado um aumento contínuo, particularmente em nações em desenvolvimento, e isso se atribui, em grande parte, à crescente ocorrência de acidentes de trânsito. Adicionalmente, a tendência global de envelhecimento da população tem contribuído para um aumento na incidência de lesões cerebrais traumáticas resultantes de quedas (Blennow et al., 2012). O Brasil emerge como uma das nações com maiores índices de TCE no mundo, com estimativas apontando para cerca de 500 casos por 100.000 habitantes, registrados no ano de 2013.

No estado do Rio Grande do Sul, aproximadamente 75% dos casos de TCE têm sua origem em acidentes de trânsito, abrangendo atropelamentos, colisões automobilísticas e incidentes envolvendo motocicletas. O risco de TCE é notadamente elevado entre adolescentes, adultos jovens, indivíduos com menos de 2 anos de idade e aqueles com mais de 75 anos, sendo que a faixa etária com maior incidência situa-se entre 15 e 24 anos, sendo mais predominante no sexo masculino. No contexto de TCE grave, a taxa de mortalidade geral oscila em torno de 30-50%, sendo notável que 90% desses óbitos ocorrem nas primeiras 48 horas subsequentes ao incidente (Blennow et al., 2012).

Em 2012, o Sistema Único de Saúde (SUS) despendeu mais de 1 bilhão de reais em atendimentos relacionados a danos cerebrais decorrentes de causas externas, englobando o TCE. Entretanto é relevante destacar que esses valores não contemplam os custos associados a tratamentos ambulatoriais, clínicas de reabilitação, medicamentos, materiais necessários para cuidados em domicílio, suporte de cuidadores, transporte e as implicações financeiras decorrentes da perda de dias de trabalho por parte dos pacientes e seus familiares (Fukujima, 2013). Portanto, é inegável que o Trauma Cranioencefálico e suas repercussões representam desafios na esfera da saúde pública, não somente no contexto brasileiro, mas também em escala global.

1.2 Mecanismos fisiopatológicos

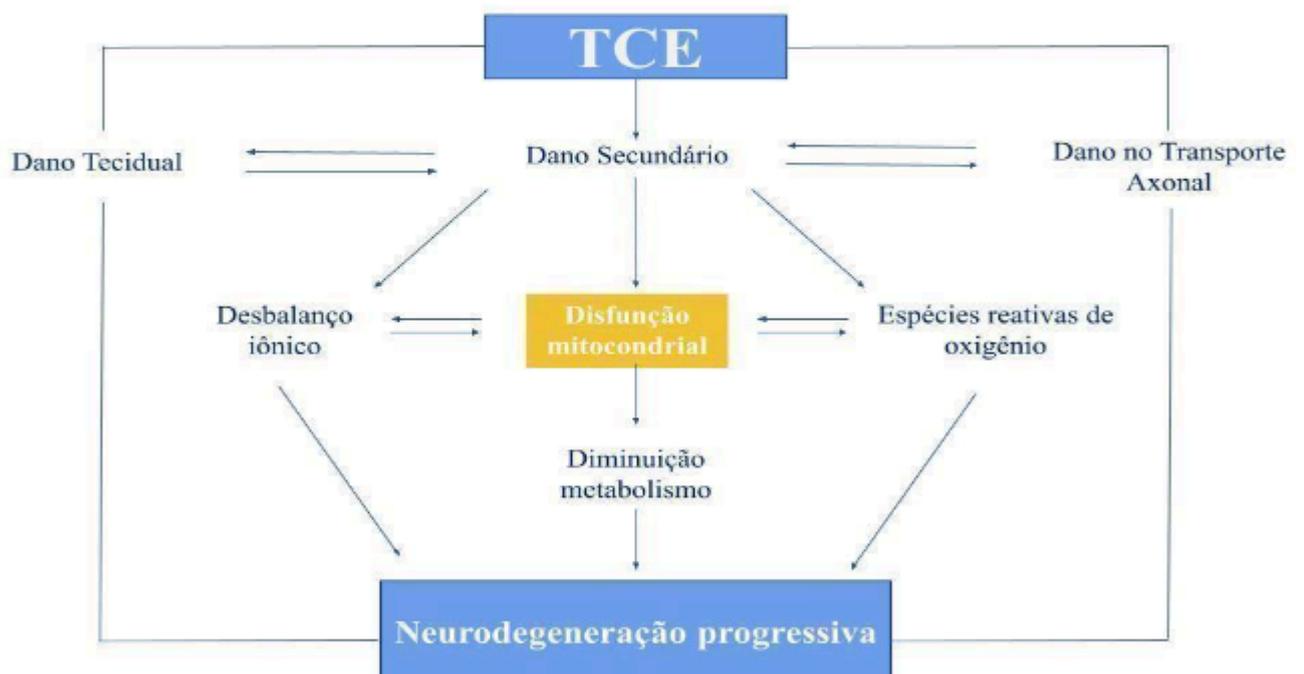
Os mecanismos fisiopatológicos associados ao TCE abrangem tanto a lesão primária, resultante do dano físico direto à massa cerebral, à ruptura de células e vasos sanguíneos, levando à liberação do conteúdo intracelular no ambiente extracelular. Esse processo cria um ambiente citotóxico prejudicial às células vizinhas. Além disso, ocorre o que é conhecido como dano secundário (Figura 4), caracterizado por alterações bioquímicas e proteicas que amplificam a extensão do dano primário. A extensão e severidade dos danos secundários estão diretamente relacionados com a gravidade do trauma e a localização da lesão primária.

Especificamente, emerge um fenômeno denominado lesão axonal difusa, que envolve uma série de mecanismos, incluindo o influxo aumentado de cálcio, a desorganização dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal devido à hiperfosforilação da proteína Tau, a clivagem da α -espectrina, causando a ruptura da rede de filamentos de actina, e a quebra dos neurofilamentos neuronais (DASH; ZHAO; HERGENROEDER; MOORE, 2010; ROOZENBEEK; MAAS; MENON, 2013). Essas perturbações nas proteínas do citoesqueleto

podem resultar tanto em morte neuronal imediata quanto, em alguns casos, ativar processos neurodegenerativos a curto e longo prazo (KAUR; SHARMA, 2018).

No cenário de neurodegeneração a longo prazo, estruturas específicas originadas da lesão inicial no axônio, conhecidas como "bulbos axonais", tornam-se críticas para determinar a sobrevivência ou morte dos neurônios. Isso ocorre devido à redução ou interrupção do fluxo de moléculas e organelas no interior do axônio (JOHNSON; STEWART; SMITH, 2013).

Figura 3. Fluxograma dos mecanismos fisiopatológicos do TCE.

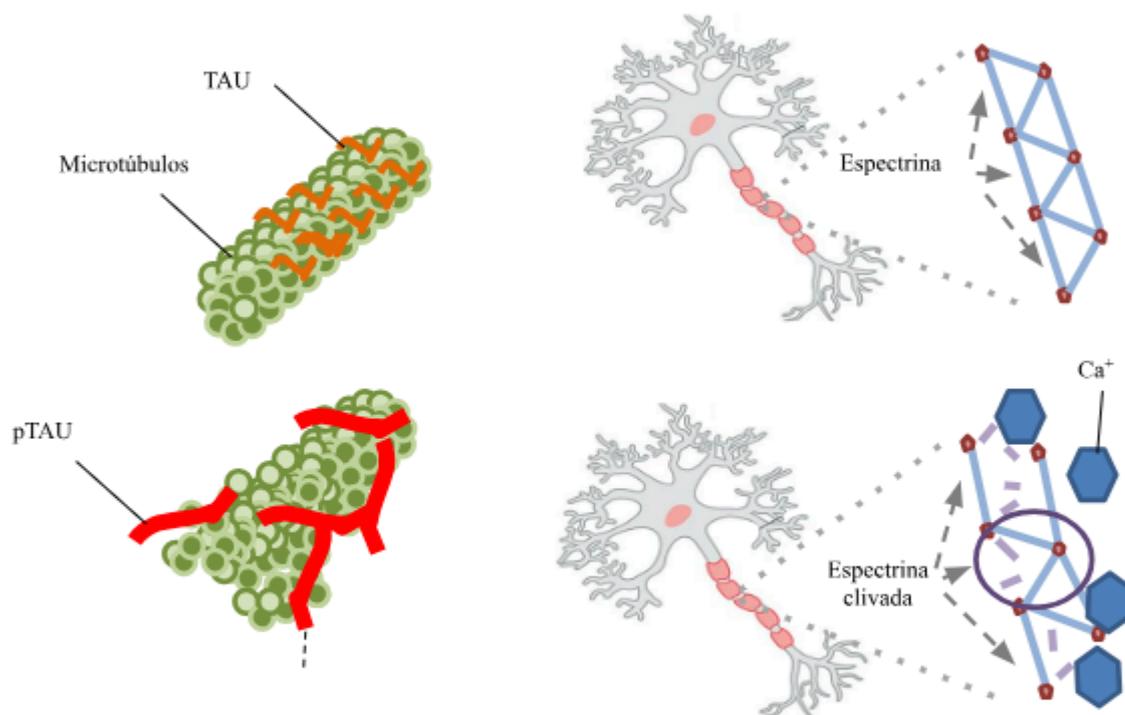


Fonte: elaborada pelo autor. Adaptado de Blennow et al. 2012

A lesão axonal difusa, caracterizada pela ruptura dos feixes axonais, formação de bulbos e varicosidades, acarreta prejuízo no transporte axonal após o TCE. Esse fenômeno resulta na ativação sustentada de uma intrincada rede de cascata de eventos neuroquímicos.

Essas cascatas acabam desencadeando a perda de conectividade neuronal, a redução do metabolismo mitocondrial e a ativação de mecanismos efetores de morte celular nas células neurais adjacentes ao local da lesão. Importante salientar que esses eventos podem propagar o dano a partir do ponto inicial de lesão (JOHNSON; STEWART; ARENA; SMITH, 2017; ROOZENBEEK; MAAS; MENON, 2013).

Figura 4. Desestruturação axonal.



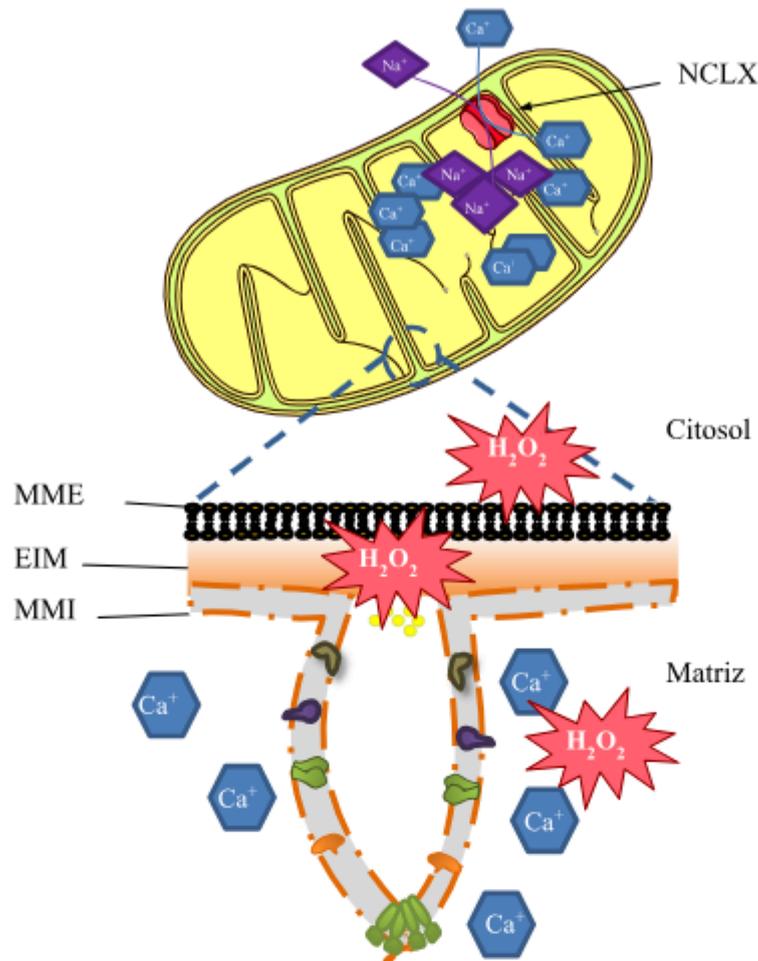
Fonte: elaborada pelo autor. (A e B) Estabilizadores de proteínas do citoesqueleto axonal, (C e D) Desestruturação do citoesqueleto axonal causado por TCE.

Além da deficiência no transporte axonal, os processos bioquímicos desencadeados pelo dano primário resultam em desequilíbrio iônico intracelular, levando ao aumento nas concentrações de íons como Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} (CONTRERAS; DRAGO; ZAMPESE; POZZAN, 2010; SUN; CHEN; GU; WANG et al., 2017). O íon mais estudado e diretamente associado ao dano secundário após TCE é o cálcio, o qual desempenha um papel crucial em diversos

processos celulares, incluindo o funcionamento do retículo endoplasmático rugoso, processos autofágicos e, principalmente no contexto do TCE, na função bioenergética mitocondrial. De forma fisiológica, as mitocôndrias captam cálcio citosólico, o qual exerce um papel regulador na atividade mitocondrial (AGARWAL; WU; HUGHES; FUKAYA et al., 2017). Entretanto, no TCE, ocorre um aumento excessivo de cálcio intramitocondrial, resultando em potenciais complicações metabólicas e funcionais para as células.

É importante destacar que o equilíbrio do cálcio intramitocondrial é um processo dinâmico que precisa se adaptar à atividade da membrana plasmática. Nesse contexto, o principal efetor da saída de cálcio mitocondrial, o transportador *sodium/calcium exchanger protein* (NCLX), que realiza a troca de três íons Na^+ citosólicos por um íon Ca^{2+} da matrix mitocondrial (LUONGO; LAMBERT; GROSS; NWOKEDI et al., 2017). O inchaço mitocondrial decorrente do excesso de cálcio leva à formação de poros de transição na membrana interna mitocondrial e alterações na capacidade de reter prótons (H^+) no espaço intermembrana. Como resultado, isso afeta a habilidade das mitocôndrias em manter e dissipar seu potencial eletroquímico, bem como a sua capacidade de desempenhar diversas funções celulares, incluindo a produção de ATP (CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI et al., 2019).

Figura 5. Dano mitocondrial.



Fonte: elaborada pelo autor. Acúmulo de cálcio no interior da mitocôndria por atividade deficiente do transportador NCLX realizar o efluxo de cálcio em troca com o sódio. Formação de poros na membrana interna da mitocôndria e produção de H_2O_2 (Adaptada de Carteri, RBK et. al. 2019). Legenda: \blacklozenge representam íons de sódio (Na^+), \blacklozenge representam íons cálcio (Ca^{2+})

A acumulação de íons carregados no interior das células cria um ambiente propício para o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLOTT, 2014). Em particular, a produção excessiva de peróxido de hidrogênio mitocondrial e ânion superóxido contribuem significativamente para o processo

neurodegenerativo secundário ao TCE. Além disso, o aumento das EROs funciona como um mecanismo de feedback positivo para o dano mitocondrial (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Assim estratégias, como a respirometria e ensaios colorimétricos, que visam monitorar o potencial de membrana e a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial, bem como seus efeitos práticos na respiração celular vem sendo utilizadas (Carteri, RBK *et al* 2019).

As alterações mitocondriais resultantes do TCE também se manifestam como prejuízos na neuroenergética, indicando que os componentes da maquinaria bioenergética mitocondrial não estão funcionando de forma coordenada com as demandas energéticas ou podem estar deficientes (FISCHER; HYLIN; ZHAO; MOORE *et al.*, 2016). Dessa forma, a capacidade de transporte de elétrons entre os complexos respiratórios, o potencial eletroquímico e a contribuição individual dos complexos no processo global de produção de ATP se tornam aspectos de interesse, uma vez que a deficiência energética conduz as células por um caminho de neurodegeneração apoptótica (DANESHVAR; GOLDSTEIN; KIERNAN; STEIN *et al.*, 2015; JOHNSON; STEWART; ARENA; SMITH, 2017). A redução na eficiência da capacidade fosforilativa da mitocôndria, seja por alguma tipo de incapacidade de transportar os elétrons de maneira eficiente, deficiência em formar ou dissipar o potencial de membrana mitocondrial ou de não estar conseguindo acoplar a utilização de oxigênio efetivamente a fosforilação de ADP é o principal indicador de piora bioenergética e, portanto, é um mecanismo que requer investigação mais aprofundada no TCE, uma vez que ainda não está completamente compreendido como pode ser modulado pelos sistemas de neurotransmissão, sinalização por íons e hormônios.

Além disso, devido aos danos bioenergéticos e à ruptura das membranas celulares, são desencadeadas sinalizações de proteínas associadas com a morte programada das células, como o aumento da *proteína X associada a BCL2* (BAX) mitocondrial e da *B-cell lymphoma*

2 (BCL2) citosólica, resultando em maior liberação de Citocromo-c pelas mitocôndrias. Esse citocromo-c atua como um ativador da via apoptótica intrínseca à caspase, culminando na acumulação de Caspase 3 clivada ao final do processo (LORENTE; MARTIN; ARGUESO; RAMOS et al., 2015; SINGH; PUSHKER; SAINI; SEN et al., 2015; WALENSKY, 2019). Assim, as respostas celulares adaptativas, em relação à capacidade de perceber as demandas energéticas e fornecer energia através da síntese mitocondrial de ATP, desempenham um papel fundamental na manutenção de todos os processos celulares. Nesse sentido, as mitocôndrias parecem atuar como um ponto de integração para todas as funções e compartimentos celulares dependentes de energia e cálcio. É válido salientar que esses aspectos relacionados à neuroenergética, embora de extrema relevância para a sobrevivência celular, ainda são objeto de investigação limitada (PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019).

Um outro ponto relacionado ao dano secundário do trauma é à perda de interações com moléculas reguladoras cerebrais que têm relação com sobrevivência tendo um papel trófico, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é inicialmente sintetizado como proBDNF e, em seguida, é clivado para formar a forma ativa do BDNF (Je et al., 2012). A clivagem extracelular do proBDNF desempenha um papel crucial na indução da potenciação de longo prazo (LTP), um processo eletrofisiológico relacionado à memória (Pang et al., 2004; Patterson et al., 1996). Após a sua liberação, o BDNF se liga aos receptores TRkB na membrana celular, ativando a proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico (CREB) por meio de fosforilação na serina 133. Esse processo leva a um aumento nos níveis de BDNF, que, por sua vez, desempenham um papel na proteção da sinalização neuronal, influenciando diversas interações sinápticas (Finkbeiner et al., 1997). Essas interações incluem a regulação da transmissão sináptica, manutenção do equilíbrio iônico, níveis de neurotransmissores e controle das espécies reativas de oxigênio (EROs),

todos dependentes da função bioenergética mitocondrial, que é regulada pela via CREB-proBDNF-BDNF. Como essa interação entre neurotrofismo e bioenergética pode ser afetada pelo TCE, ela se apresenta como um alvo potencial para terapias (Cheng et al., 2010; Correia et al., 2010b; Correia et al., 2010a; Zhao et al., 2021).

No entanto, apesar do potencial terapêutico de outras neurotrofinas, a administração exógena de BDNF após o TCE não tem demonstrado aumento da sobrevivência de neurônios nem benefícios cognitivos significativos (Blaha et al., 2000; Conte et al., 2008). Enquanto nenhum tratamento farmacológico atual altera os desfechos a longo prazo relacionados ao TCE, estudos sugerem que o aumento endógeno na via CREB-BDNF, por meio de intervenções no estilo de vida, como o exercício físico, pode oferecer mecanismos de modificação da doença para combater as cascatas de lesões secundárias após o TCE (Fogelman and Zafonte, 2012; Griesbach et al., 2007; Vaynman et al., 2004). O exercício físico regular promove o aumento da expressão de BDNF no cérebro de forma dependente do tempo, fornecendo neuroproteção que pode beneficiar os indivíduos ao longo da vida (Berchtold et al., 2005). De fato, evidências recentes destacam que o pré-condicionamento pelo exercício pode proteger os neurônios contra a disfunção e a degeneração associadas ao TCE (Raefsky and Mattson, 2017).

A compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos no TCE é de importância fundamental para o desenvolvimento de estratégias destinadas a combater a progressão do dano secundário e as alterações neurológicas a longo prazo (IVERSON; GARDNER; TERRY; PONSFORD et al., 2017; LAWRENCE; HUTCHISON, 2017). No entanto, as evidências que indicam a existência de alterações expansivas em relação ao local de origem do impacto ainda são escassas. Um aspecto intrigante é que a perda tardia de mobilidade e

coordenação motora após TCE é relativamente comum em atletas, mesmo na ausência de impactos diretos na medula espinhal ou nas pernas.

1.3 Tratamento para o TCE

A terapia, hoje aprovada pelo FDA e ANVISA para o tratamento de pacientes com TCE, é bastante limitada, sendo focada principalmente na estabilização do paciente do que propriamente a melhora dos danos causados. Isso se deve ao fato de que o dano causado pelo TCE resulta da combinação de múltiplos mecanismos, o que gera uma variedade de sintomas agudos e crônicos, bem como um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos ainda são necessários. Isso sugere que tratamentos que combinem várias estratégias podem ser mais eficazes do que o uso de substâncias isoladas. Embora muitos candidatos promissores tenham surgido em estudos pré-clínicos, a evidência sólida de ensaios clínicos randomizados multicêntricos é escassa. Inibidores da acetilcolinesterase são substâncias que mostram potencial para melhorar os resultados neurológicos (Diaz-Arrastia et al., 2014, Volovici, V., 2019).

Tabela 1. Manejo dos pacientes	
Monitorização	São monitorizados os sinais vitais, nível de consciência, pressão intracraniana, níveis glicêmicos (tratamento com glicose/insulina)
Cirurgia	Em alguns casos graves, pode ser necessário realizar uma cirurgia para aliviar a pressão

	intracraniana (craniotomia).
Medicamentos:	<ul style="list-style-type: none"> ● Analgésicos ● Anti-inflamatórios ● Medicamentos para reduzir a pressão intracraniana, como manitol ou solução hipertônica. ● Anticonvulsivantes ● Controles de Pressão ● Antibióticos
Reabilitação:	Fisioterapia, acompanhamento e dietoterapia.

Dessa forma, estratégias que visem profilaxia surgem como uma grande oportunidade para ajudar no quadro de um possível TCE. Não apenas para o trauma mas esse tipo de estratégia é um ponto focal para diversos tipos de patologias que têm o mesmo perfil multifatorial como por exemplo diabetes e doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. Já se tem demonstrado a importância do exercício físico no controle glicêmico bem como sua importância para construir reservas neurotróficas.

1.4 Reserva cognitiva

O termo "reservas cerebrais" é uma construção conceitual que se refere à capacidade intrínseca do cérebro de compensar danos ou perdas de função, resultantes de lesões, processo de envelhecimento ou condições patológicas. Este conceito implica que determinados indivíduos possuem uma maior capacidade de resistência a danos cerebrais, e os sintomas clínicos podem ser adiados devido à presença dessas "reservas" de recursos cerebrais (Bennett, D. A.2005).

Diversas teorias têm sido propostas para explicar o funcionamento dessas reservas cerebrais, das quais as principais incluem: 1) Reserva Cognitiva: refere-se à habilidade do cérebro de manter o funcionamento normal mesmo na presença de lesões cerebrais ou condições patológicas subjacentes; 2) Reserva Neural: A reserva neural sugere que o cérebro possui uma capacidade intrínseca de compensar lesões ou disfunções por meio da ativação de redes neurais alternativas. Mesmo que uma região específica do cérebro seja danificada, outras áreas podem assumir suas funções, permitindo a recuperação ou adaptação; 3) Reserva Estrutural: A reserva estrutural diz respeito à presença de um maior número de neurônios, sinapses ou conexões cerebrais do que o necessário para as funções cotidianas. O BDNF que é um fator neurotrófico importante para neuroplasticidade e neurogênese, também tem papel para induzir a mitogênese, ou seja aumentar o número de mitocôndrias, da forma impactando positivamente o metabolismo energético cerebral (Marosi and Mattson, 2014).

Embora o conceito de reservas cerebrais seja amplamente reconhecido, ainda não foi completamente elucidado como essas reservas operam e de que maneira podem ser otimizadas, bem como seu conceito para a neuroquímica, indicando quais os efetores bioquímicos são chave para seu entendimento (Jones, R. N., & Manly, J.,2011, Freret, T, 2015). No entanto, existem evidências que sugerem que a constante estimulação cognitiva, atividade física e um estilo de vida saudável podem contribuir para o aumento das reservas cerebrais,

auxiliando, assim, na preservação da função cerebral, mesmo em face do envelhecimento e condições neurológicas (Stern, Y., 2009). Sendo assim poderia esse ser um caminho para o entendimento da terapêutica para o TCE como um todo, servindo tanto como profilaxia bem como auxiliando em possíveis intervenções farmacológicas.

1.5 Exercício Físico

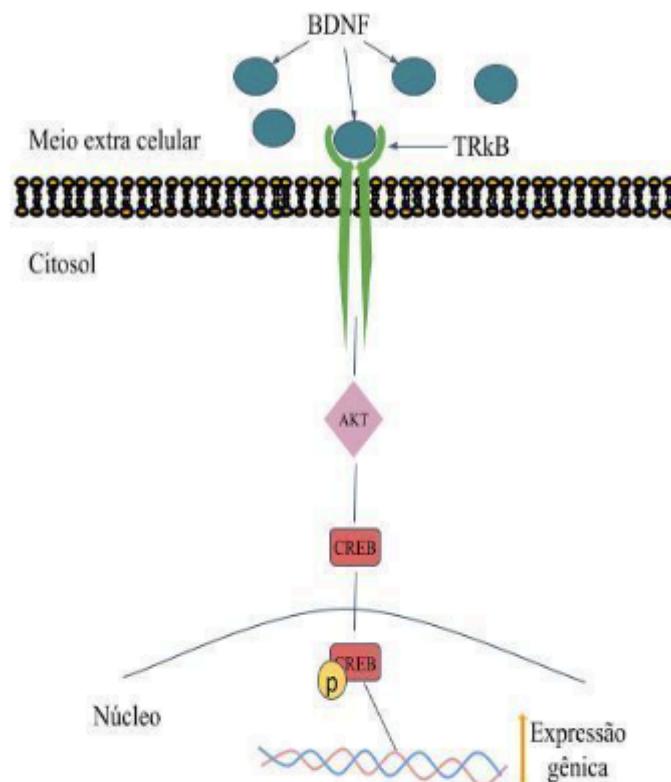
Uma das estratégias profiláticas mais prevalentes na sociedade é a prática de atividade física que é responsável por trazer benefícios abrangentes para a saúde, indo desde melhoras no controle de níveis glicêmicos, aumento da capacidade cognitiva por indução de fatores neurotróficos e neuroprotetores. Porém, os mecanismos neuroprotetores da atividade física prévia a um TCE ainda carecem de mais estudos. Existem indícios que apontam para o aumento de fatores neurotróficos, perfusão cerebral e metabolismo, acompanhados pela diminuição do estresse oxidativo, como possíveis biomarcadores que indiretamente refletem as reservas neurais impulsionadas pelo exercício (Cheng, 2016).

No contexto do treinamento esportivo, o termo "volume" refere-se à quantidade total de exercícios realizados em um período determinado. Por exemplo, para um mesmo tipo de estímulo de exercício, diferentes volumes podem ser alcançados mediante a prescrição de treinos diários ou a treinos realizados em dias alternados (Weineck, 2019).

É desafiador determinar se os fatores associados ao suporte neurotrófico e à capacidade neuroenergética podem servir como substratos para a reserva cerebral, modulados por diferentes volumes de exercício. Além disso, é relevante investigar se um maior volume de exercício promove reservas cerebrais mais eficazes para a neuroproteção do que um volume menor. A questão fundamental do ponto de vista translacional reside em saber se um indivíduo que se exercita diariamente e sofre um TCE grave terá desfechos neurofuncionais

melhores em comparação com alguém que se exercita esporadicamente (ou seja, três vezes por semana).

Figura 6. Sinalização de BDNF



Fonte: elaborada pelo autor. Sinalização de BDNF induzida por exercício. (Adaptada de Zarneshan, S.N. et al 2022). Legenda: BDNF, AKT, CREB, Fosfato.

Portanto, neste estudo, analisamos os impactos de diferentes volumes de exercício físico na formação de reservas neurotróficas e neuroenergéticas em camundongos. Também investigamos se a formação de reservas cerebrais atenua a deterioração cognitiva subsequente a um TCE grave em camundongos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal desta dissertação foi investigar o efeito de diferentes volumes de exercício físico como estratégia para criar reservas neuroenergéticas e neurotróficas que possam servir para atenuar os danos causados por um TCE grave.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Protocolos de exercício físico: estabelecer dois protocolos com volumes diferentes de exercício físico.

2.2.2 Indução de TCE: realizar um TCE grave para entender melhor mecanismos que possam auxiliar no combate a sua fisiopatologia.

2.2.3 Parâmetros neuroquímicos neurotróficos: imunócontido das proteínas da via pCREBSer¹³³-pro-BDNF-BDNF.

2.2.4 Avaliação mitocondrial: respirometria, potencial de membrana e produção de peróxido mitocondrial

2.2.5 Avaliação perfil comportamental: locomoção espontânea e dano motor no campo aberto, aprendizado e memória espacial com labirinto aquático de Morris.

Artigo publicado no periódico *Experimental Neurology* – 2023

Capítulo II

**Lower and higher volumes of physical exercise build up brain reserves against
memory deficits triggered by a head injury in mice**

Afonso Kopczynski¹, Randhall B. Carteri, *Ph.D.*^{1,2,3}, Marcelo S. Rodolphi, *M.Sc.*¹, Jean P. Oses, *Ph.D.*⁴, Luiz O. Portela, *Ph.D.*⁵, Cesar A. Geller, *Ph.D.*⁵, Vitória G. de Oliveira¹, Marco Antonio De Bastiani, *Ph.D.*⁶, Nathan R. Strogulski, *Ph.D.*^{1,7} Douglas H. Smith, *M.D.*⁸, *Luis V. Portela, *Ph.D.*¹

¹ Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores - Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Centro Universitário Metodista – Departamento de Nutrição, Instituto Porto Alegre, IPA - Porto Alegre, Brasil.

³ CESUCA Centro Universitário, Departamento de Nutrição – Cachoeirinha, RS, Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

⁵ Laboratório de Performance em Ambiente Simulado (LAPAS), Centro de Educação Física, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

⁶ Zimmer Neuroimaging Lab, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Capítulo III

Discussão

Neste estudo, vimos que o pré-condicionamento com diferentes protocolos de exercício independente do volume resultou no aumento das reservas neurotróficas e bioenergéticas cerebrais. Essa reserva aumentou a sobrevivência pós TCE, bem como evitou prejuízos de memória e bioenergéticos. Os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao TCE, classicamente, demonstram uma diminuição de sinalizadores neurotróficos e de neuroplasticidade juntamente com um aumento de marcadores neurodegenerativos. Entretanto, fatores relacionados ao estilo de vida ativo podem ser importantes para recuperar este esse desequilíbrio (Raefsky e Mattson, 2017).

A utilização de protocolos com exercício físico vem sendo incluídos junto à terapia após um TCE, por gerarem adaptações moleculares que podem auxiliar na recuperação dos danos secundários (Archer et al., 2012; Cunnane et al., 2020; Fogelman e Zafonte, 2012; Itoh et al., 2011a, 2011b). Os resultados deste estudo reforçam ainda mais o potencial profilático das adaptações cerebrais induzidas pelo exercício para aumentar a resiliência neuronal em resposta a danos agudos (Fiorin et al., 2016; Zhao et al., 2015). Essa capacidade de recuperação provavelmente contribui para a diminuição da taxa de mortalidade nas primeiras 48 horas após um TCE grave, um período em que os mecanismos de dano inicial estão mais elevados como a ruptura das membranas celulares, o dano axonal e a excitotoxicidade glutamatérgica (Corrigan et al., 2017).

Em um estudo clínico produzido pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que os níveis elevados de glutamato no líquido cefalorraquidiano de pacientes admitidos na UTI estavam associados a um risco maior de morte cerebral dentro de 3 dias após um TCE grave, enquanto pacientes com níveis mais baixos de glutamato tiveram desfechos neurológicos mais favoráveis (Stefani et al., 2017).

Estes resultados indicam potenciais mecanismos onde a ação profilática do exercício poderia atuar, visto que a atividade física está associada com um aumento no número de astrócitos acarretando em uma maior captação de glutamato extracelular, diminuindo seu excesso e conseqüentemente ajudando no combate da excitotoxicidade, dessa forma, reduzindo a mortalidade (Dietrich et al., 2005; Li et al., 2021; Li et al., 2005). No entanto, vale ressaltar que essa hipótese não foi testada neste estudo e permanece no domínio da especulação.

Diversos modelos pré-clínicos têm ajudado a elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos danos relacionados ao TCE. Entretanto os alvos terapêuticos bem como os tratamentos propostos não conseguiram ser transacionados para a clínica com sucesso. Sendo assim, ainda é necessário o desenvolvimento de estratégias para ajudar a reduzir as altas taxas de mortalidade e as sequelas neurológicas causadas pelo TCE (Smith et al., 2021). Nas últimas duas décadas houve pouco avanço terapêutico, mostrando o quão escassas as possibilidades de tratamento (Volovici et al., 2019).

As pesquisas relacionadas ao campo apresentam grande dificuldades de avanço por conta de coortes pequenas nos estudos clínicos randomizados, que acabam dificultando para gerar resultados mais robustos. Além disso, os estudos pré-clínicos apresentam limitações com relação ao seu poder translacional. A falta da comunicação entre esses dois tipos de pesquisa influencia na dificuldade de gerar novas estratégias terapêuticas (Bragge et al., 2016). No entanto, essas dificuldades ressaltam a importância de estabelecer uma ponte entre os estudos pré-clínicos e clínicos, evitando as discrepâncias conceituais ainda existentes (Smith et al., 2021).

Pacientes com diagnóstico de um TCE grave (Score da escala de Glasgow entre 3 e 8) apresentam não apenas uma elevada mortalidade, mas também alterações em diversos

biomarcadores após a admissão hospitalar que indicam uma piora no prognóstico (Strogulski et al., 2022). Nossos resultados, para animais sem exercício, apresentaram uma mortalidade de 40% nas 48 horas posteriores ao TCE grave, mimetizando os achados clínicos. Outro ponto que nos concentramos, para concretizar esse modelo como um “*back-translation*”, foi na escala de dano neurológica que foi avaliada 24 horas após a lesão (uma escala de 6 pontos que avalia reflexos e função motora) (Carteri et al., 2019), essa análise confirmou a gravidade dos déficits neurológicos nos grupos submetidos ao TCE (dados não apresentados).

Utilizamos um modelo de TCE por impacto cortical controlado (ICC) para replicar a severidade observada em pacientes humanos com TCE grave, gerando modificações neurológicas e alta taxa de mortalidade. A maioria dos modelos por ICC usa parâmetros que resultam em uma baixa taxa de mortalidade, com pouca disfunção motora após a lesão. No entanto, esses resultados não refletem as condições de TCE grave observadas em seres humano. (Smith et al., 2021).

A redução da mortalidade nem sempre se traduz em uma melhora na qualidade de vida dos pacientes, mas, em vez disso, pode resultar em um aumento no número de sobreviventes com estados vegetativos ou deficiências graves (Menon e Maas, 2015; Nichol et al., 2015). Além disso, enfatizamos a relevância do exercício físico preventivo, uma abordagem comumente recomendada para doenças vasculares, cardíacas e metabólicas, como uma estratégia capaz de oferecer proteção contra os mecanismos que causam implicações neurológicas desfavoráveis de curto e longo prazo relacionadas a um TCE grave.

Portanto, investigamos a seguir se volumes menores e maiores de exercício (LV e HV) influenciam os componentes tradicionais envolvidos na plasticidade sináptica e nas respostas adaptativas aos desafios, ou seja, o suporte neurotrófico e bioenergético. Descobrimos que o eixo pCREBSer¹³³-proBDNF-BDNF no hipocampo foi positivamente regulado,

independentemente do volume do exercício. É notável que essas adaptações tenham sido observadas trinta dias após a interrupção do exercício, destacando a importância do volume, representado pela distância total percorrida na roda de corrida voluntária, como uma variável crítica para manter o suporte neurotrófico a longo prazo.

Outros estudos demonstraram que os níveis de BDNF estão diretamente relacionados à distância percorrida na rodinha (Cotman e Berchtold, 2002). Nesse contexto, a inibição dessa via (inibição do receptor TRkB) resultou na perda dos benefícios com relação a níveis de CREB, neuroplasticidade e função cognitiva, reforçando a importância dessa interação funcional (Vaynman et al., 2004; Vaynman et al., 2003).

Um estudo prévio comparou a eficácia de duas intensidades diferentes de exercício nos níveis da via TRkB-BDNF-CREB. Onde o exercício de baixa intensidade na esteira foi benéfico para a memória espacial enquanto o exercício de alta intensidade gerou prejuízos na sinalização neurotrófica e conseqüentemente na resposta ao teste de memória espacial. (Wu et al., 2020). Por outro lado, os treinamentos de intensidade moderada e o intervalado de alta intensidade apresentaram melhorias nos níveis de sanguíneos de BDNF em homens sedentários com sobrepeso (de Lima et al., 2022). Em outro trabalho o treinamento de alta intensidade apresentou resultados semelhantes, tendo aumento dos níveis de BDNF e melhora nas habilidades motoras (Helm et al., 2017). Dessa forma fica evidente a necessidade por um melhor entendimento sobre o volume, duração e intensidade de exercício necessária para se ter os benefícios adaptativos.

Sendo assim, neste trabalho observamos que ambos os volumes de exercício foram capazes de prevenir os prejuízos na sinalização de pCREBSer¹³³-pro-BDNF-BDNF no cérebro após um TCE grave, mesmo 30 dias após o término do protocolo de exercício. Também um programa de exercício voluntário de 4 semanas já demonstrou uma resposta

aguda nas expressões de BDNF-CREB (dentro de 24 horas), no córtex após um TCE grave. Além disso, demonstraram uma redução na liberação de citocromo-c e conseqüentemente da ativação da via das caspases (Zhao et al., 2015). Apesar de não terem estendido sua investigação dos níveis de BDNF-CREB além do período inicial de 24 horas, esses autores observaram efeitos neuroprotetores de duração prolongada (entre 14 e 28 dias após o trauma) em relação às alterações secundárias tradicionalmente associadas ao TCE, tais como prejuízos na memória espacial e no reconhecimento (Zhao et al., 2015).

Outro protocolo de exercício prévio ao TCE, com nado forçado por 6 semanas, apresentou aumento dos níveis de BDNF no hipocampo em 24 horas e 15 dias após o trauma, esses valores estando relacionados a uma preservação da memória de reconhecimento (Fiorin et al., 2016). Esse aumento foi perceptível quando comparado ao grupo controle tendo um resultado ainda mais expressivo quando comparado ao grupo TCE não exercitado (cerca de 150% maior) no décimo quinto dia. Além disso, os níveis de BDNF apresentaram um aumento no 15 dia quando comparados aos níveis 24 horas após o trauma, isso sugerindo uma sinalização prolongada e efeito neurotrófico a longo prazo gerado pelo exercício. Como mencionado anteriormente, os resultados do nosso protocolo indicam que esses benefícios podem se manter por ainda mais tempo podendo chegar até trinta dias.

Embora estudos clínicos e pré-clínicos tenham demonstrado que os aumentos nos níveis de BDNF permanecem por semanas após o término dos protocolos de exercício (Berchtold et al., 2005; Russo-Neustadt et al., 1999; Szuhany e Otto, 2020), a dinâmica desses níveis de expressão ainda necessita ser mais explorada. No entanto, um estudo com adultos saudáveis demonstrou uma correlação positiva entre o aumento do volume hipocampal e os níveis séricos de BDNF após um ano de treinamento aeróbico moderado (Erickson et al., 2011). Adicionalmente, observou-se que sinalizações hipocampais tem correlação com a

melhora da memória. Os autores propõem que mudanças morfológicas, tais como o aumento da proliferação celular, o desenvolvimento dendrítico e a vascularização, podem ser responsáveis pelos benefícios observados nos indicadores de desempenho da memória (de la Rosa et al., 2019; Levine et al., 1995; Von Bohlen Halbach, 201

Um outro protocolo com treinamento aeróbico moderado de cinco semanas indicou que os níveis séricos de BDNF em repouso ($10,3 \pm 1.4$ pg/mL para $16,8 \pm 2.1$ pg/mL) em homens saudáveis (Zoladz et al., 2008). Esses resultados destacam a importância do exercício físico na promoção e sustentação de adaptações mediadas pelo BDNF, abrangendo uma ampla gama de componentes (Berchtold et al., 2005; Berchtold et al., 2002; Liu e Nusslock, 2018).

A ativação promovida pelo exercício da via pCREBSer¹³³-pro-BDNF-BDNF está associada a adaptações mitocondriais e melhora na função bioenergética (Mattson, 2012; Raefsky e Mattson, 2017). Essa melhora provavelmente está relacionada à dinâmica mitocondrial de eliminação das mitocôndrias disfuncionais (mitofagia ou fissão), a um aumento na atividade de enzimas metabólicas e modificações nas proteínas de complexos mitocondriais (Huang et al., 2019; Kinni et al., 2011). É importante notar que os níveis de *PGC1 α* , um regulador da biogênese, não apresentaram mudanças após trinta dias de intervenção com exercícios ou após o TCE (dados não apresentados). No entanto, observamos que a melhoria da função bioenergética mitocondrial induzida pelo exercício, independente do volume, se traduz em uma melhora na transferência de elétrons, bem como uma melhor capacidade respiratória associada à síntese de ATP (consulte a Figura 3 B, C, D, E) e uma redução na produção de H₂O₂, seja estimulada por substratos metabólicos ou não (basal) (Figura 3G). Nossos dados corroboram dados prévios da literatura que demonstraram a eficácia do exercício físico no metabolismo bioenergético (Ding et al., 2006).

Contrastante aos nossos resultados, estudos anteriores com treinamento em esteira não afetaram a respiração mitocondrial associada ao complexo I, complexo II e ATP sintase no cérebro de camundongos adultos (Gusdon et al., 2017). Apesar disso, a maioria dos estudos indica que o exercício tem impacto positivo na função dos complexos mitocondriais, no aumento na atividade da FoF1-ATP sintase, na regulação e produção de espécies reativas de oxigênio e neuroproteção. Estes dados indicam que o exercício exerce uma ação abrangente sobre os processos da bioenergética, promovendo uma atividade coordenada do metabolismo oxidativo que pode mitigar os mecanismos de neurodegeneração (Cheng et al., 2010; Mattson, 2012; Mattson e Arumugam, 2018; Raefsky e Mattson, 2017).

O TCE é amplamente reconhecido por agravar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), associado a um prejuízo no fluxo do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e em última instância na transferência de elétrons e nos complexos respiratórios (Yonutas et al., 2016). Nossos achados indicam que ambos volumes de exercício prévio preservaram eficiência mitocondrial (BCE) em comparação com os animais com TCE que não se exercitaram, o que implica uma alta eficiência na maquinaria metabólica mitocondrial para a síntese de ATP (Nedel et al., 2021). Ambos os volumes de exercício também reduziram o extravasamento de prótons mitocondriais e a produção de H_2O_2 após o TCE. Trabalhos anteriores demonstraram um aumento nas defesas antioxidantes (Nrf2, SOD) ocasionadas pelo exercício prévio, novamente indicando um papel profilático contra os danos oxidativos causados pelo TCE (Fiorin et al., 2016; Hill et al., 2017; Ji et al., 2012b; Ji et al., 2012a). Outro efeito benéfico do exercício é a redução de proteínas proteolíticas que causam a ruptura da membrana mitocondrial após o TCE (Zhao et al., 2015).

Com base nos dados publicados, o engajamento no exercício físico previamente ao TCE preveniu o dano ao potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (formação e dissipação),

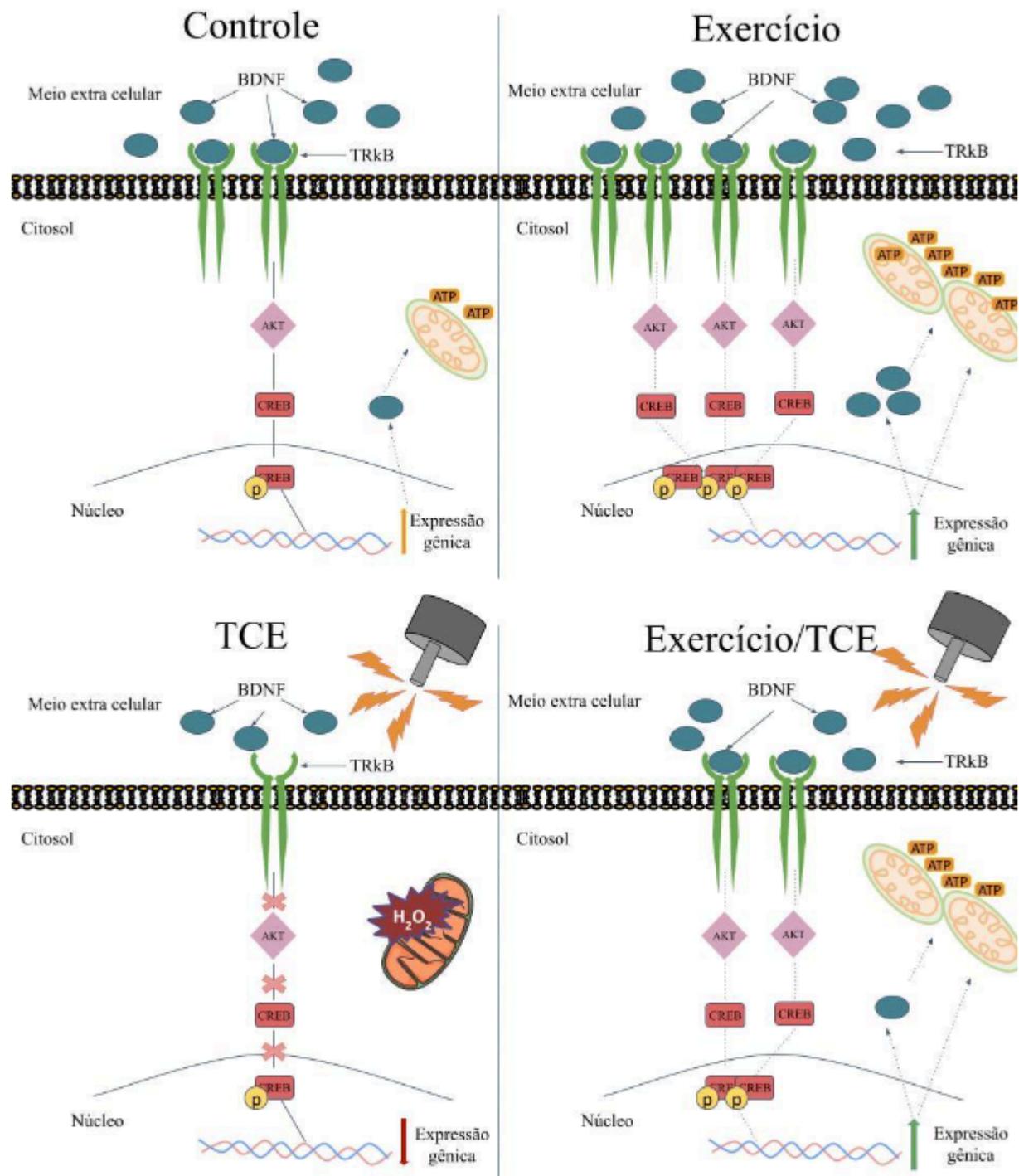
sendo esse um indicativo de preservação da membrana mitocondrial o que é corroborado pela diminuição na produção de H_2O_2 e na manutenção BCE. Sendo assim, os principais marcadores funcionais da eficiência bioenergética mitocondrial são sustentados por ambos os volumes de exercício após o TCE.

Apesar de demonstrarem aprimorar tanto as reservas cerebrais neurotróficas quanto bioenergéticas, o melhor entendimento de como o exercício físico pode ajudar a prevenir o prejuízo à memória se torna muito importante. (Brown et al., 2011). Pacientes com TCE frequentemente enfrentam sintomas neuropsiquiátricos persistentes, nosso protocolo investiga, com uma abordagem translacional, o efeito profilático do exercício físico com relação aos prejuízos de memória a longo prazo decorrentes de um TCE I. Lesões hipocampais, dano axonal e cascatas bioquímicas secundárias são marcadores fisiopatológicos chave do prejuízo ocasionado pelo TCE associado a perda de memória(Thompson et al., 2005).

Observamos que os animais que haviam sido submetidos aos protocolos de exercício não tiveram problemas visuais para encontrar a bandeira no teste de acuidade visual e nem prejuízo no treinamento diário do labirinto aquático de Morris (MWM). Dessa maneira demonstrando uma capacidade preservada de aprendizado e aquisição de memória. No teste (ausência da plataforma no quadrante alvo), os camundongos exercitados, sem trauma, ficaram mais tempo no quadrante-alvo. Esse resultado sugere que a via pCREBSer¹³³-pro-BDNF-BDNF e a melhora da eficiência bioenergética mitocondrial estão envolvidas com a criação da reserva cognitiva.

Figura Resumo

Figura 7. Resumo Gráfico



Fonte: Resumo do Trabalho, elaborado pelo autor. (A) Condição normal da sinalização neurotrófica e bioenergética. (B) Aumento das reservas cerebrais decorrentes do exercício

físico. (C) Diminuição da sinalização neurotrófica e do metabolismo bioenergético, ambos causados pelo TCE. (D) As vias de sinalizações mantêm, mesmo após um TCE, devido a reserva cerebral construída pelo exercício físico.

Conclusão

Na presente dissertação apresentamos a possibilidade de gerar reservas de BDNF e bioenergética mitocondrial a partir de dois diferentes volumes de exercício. O pré-condicionamento com volumes menores e maiores de exercício promoveu de forma semelhante as reservas cerebrais associadas à preservação da função de memória após um TCE grave. Esses resultados reiteram uma ligação importante entre o estilo de vida e mecanismos de sobrevivência com relação ao TCE.

Diante das evidências apresentadas, é possível adicionar mais um ponto na importância que as mudanças do metabolismo mitocondrial têm no entendimento dos processos tanto degenerativos quanto de sobrevivência após o TCE. Além disso, o trabalho ressalta a importância que o exercício independente a seu volume apresenta possíveis benefícios tanto em condições normais quanto após um processo deletério como um TCE.

Perspectivas

Pretendemos avaliar os efeitos da manutenção do exercício após o TCE, como uma estratégia de manipulação. Hoje na literatura os protocolos de exercício pós TCE ainda são ponto focal de discussões, visto que não se sabe o melhor manejo, seja mantendo exercícios leves, exercícios intensos ou repouso. Outro ponto será a utilização de protocolos de exercício para pré-condicionar mitocôndrias para uma possível mitoterapia.

Referências

AGARWAL, A.; WU, P. H.; HUGHES, E. G.; FUKAYA, M. et al. Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. *Neuron*, 93, n. 3, p. 587-605.e587, Feb 8 2017.

AHMED, S. M.; RZIGALINSKI, B. A.; WILLOUGHBY, K. A.; SITTERDING, H. A. et al. Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 74, n. 5, p. 1951-1960, May 2000.

ALONSO, A. D.; COHEN, L. S.; CORBO, C.; MOROZOVA, V. et al. Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Front Cell Neurosci*, 12, p. 338, 2018.

BEN-SHACHAR, D.; ENE, H. M. Mitochondrial Targeted Therapies: Where Do We Stand in Mental Disorders? *Biol Psychiatry*, 83, n. 9, p. 770-779, May 1 2018.

BLENNOW, K.; BRODY, D. L.; KOCHANEK, P. M.; LEVIN, H. et al. Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers*, 2, p. 16084, Nov 17 2016.

BLENNOW, K.; HARDY, J.; ZETTERBERG, H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*, 76, n. 5, p. 886-899, Dec 6 2012.

BOMBARDIER, C. H.; LEE, D. C.; TAN, D. L.; BARBER, J. K. et al. Comorbid Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury: Screening Validity and Effect on Outcomes. *Arch Phys Med Rehabil*, 97, n. 10, p. 1628-1634, Oct 2016.

BRAUN, M.; VAIBHAV, K.; SAAD, N. M.; FATIMA, S. et al. White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863, n. 10 Pt B, p. 2614-2626, Oct 2017.

BRETNALL, M.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; DE GUEVARA, R. L.; CEPERO, E. et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*, 14, p. 32, Jul 9 2013.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, p. Unit 8.12, Aug 2001.

CARTERI, R. B.; KOPCZYNSKI, A.; MENEGASSI, L. N.; SALIMEN RODOLPHI, M. et al. Anabolic-androgen steroids effects on bioenergetics responsiveness of synaptic and extrasynaptic mitochondria. *Toxicol Lett*, 307, p. 72-80, Jun 1 2019.

CARTERI, R. B.; KOPCZYNSKI, A.; RODOLPHI, M. S.; STROGULSKI, N. R. et al. Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *J Neurotrauma*, Apr 9 2019.

CHEN, S.; SHI, Q.; ZHENG, S.; LUO, L. et al. Role of alpha-II-spectrin breakdown products in the prediction of the severity and clinical outcome of acute traumatic brain injury. *Exp Ther Med*, 11, n. 5, p. 2049-2053, May 2016.

CHEN, X.; CUI, J.; ZHAI, X.; ZHANG, J. et al. Inhalation of Hydrogen of Different Concentrations Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Protecting Spinal Cord Neurons from Apoptosis, Oxidative Injury and Mitochondrial Structure Damages. *Cell Physiol Biochem*, 47, n. 1, p. 176-190, 2018.

CHOE, M. C. The Pathophysiology of Concussion. *Curr Pain Headache Rep*, 20, n. 6, p. 42, Jun 2016.

CONTRERAS, L.; DRAGO, I.; ZAMPESE, E.; POZZAN, T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*, 1797, n. 6-7, p. 607-618, Jun-Jul 2010.

DANESHVAR, D. H.; GOLDSTEIN, L. E.; KIERNAN, P. T.; STEIN, T. D. et al. Post-traumatic neurodegeneration and chronic traumatic encephalopathy. *Mol Cell Neurosci*, 66, n. Pt B, p. 81-90, May 2015.

DASH, P. K.; ZHAO, J.; HERGENROEDER, G.; MOORE, A. N. Biomarkers for the diagnosis, prognosis, and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7, n. 1, p. 100-114, Jan 2010.

DE CARVALHO, A. K.; DA SILVA, S.; SERAFINI, E.; DE SOUZA, D. R. et al. Prior Exercise Training Prevent Hyperglycemia in STZ Mice by Increasing Hepatic Glycogen and Mitochondrial Function on Skeletal Muscle. *J Cell Biochem*, 118, n. 4, p. 678-685, Apr 2017.

DEWAN, M. C.; RATTANI, A.; GUPTA, S.; BATICULON, R. E. et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg*, p. 1-18, Apr 1 2018.

DU, Z. Q. BAX, a novel cell pro-apoptotic protein, involved in hemocytes early antiviral immune response in fresh water crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol*, 55, p. 384-392, Aug 2016.

EL-HATTAB, A. W.; ZARANTE, A. M.; ALMANNAI, M.; SCAGLIA, F. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol Genet Metab*, 122, n. 3, p. 1-9, Nov 2017.

EMANI, S. M.; PIEKARSKI, B. L.; HARRILD, D.; DEL NIDO, P. J. et al. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 154, n. 1, p. 286-289, Jul 2017.

FAUL, M.; CORONADO, V. Epidemiology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*, 127, p. 3-13, 2015.

FISCHER, T. D.; HYLIN, M. J.; ZHAO, J.; MOORE, A. N. et al. Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. *Front Syst Neurosci*, 10, p. 29, 2016.

FRATI, A.; CERRETANI, D.; FIASCHI, A. I.; FRATI, P. et al. Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*, 18, n. 12, Dec 2 2017.

GLUSHAKOVA, O. Y.; GLUSHAKOV, A. O.; BORLONGAN, C. V.; VALADKA, A. B. et al. Role of Caspase-3-Mediated Apoptosis in Chronic Caspase-3-Cleaved Tau Accumulation and Blood-Brain Barrier Damage in the Corpus Callosum after Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*, 35, n. 1, p. 157-173, Jan 1 2018.

HIEBERT, J. B.; SHEN, Q.; THIMMESCH, A. R.; PIERCE, J. D. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Med Sci*, 350, n. 2, p. 132-138, Aug 2015.

HIRANO, M.; EMMANUELE, V.; QUINZII, C. M. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem*, 62, n. 3, p. 467-481, Jul 20 2018.

IVERSON, G. L.; GARDNER, A. J.; TERRY, D. P.; PONSFORD, J. L. et al. Predictors of clinical recovery from concussion: a systematic review. *Br J Sports Med*, 51, n. 12, p. 941-948, Jun 2017.

JASSAM, Y. N.; IZZY, S.; WHALEN, M.; MCGAVERN, D. B. et al. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*, 95, n. 6, p. 1246-1265, Sep 13 2017.

JOHNSON, V. E.; STEWART, W.; ARENA, J. D.; SMITH, D. H. Traumatic Brain Injury as a Trigger of Neurodegeneration. *Adv Neurobiol*, 15, p. 383-400, 2017.

JOHNSON, V. E.; STEWART, W.; SMITH, D. H. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 246, p. 35-43, Aug 2013.

KAMINS, J.; GIZA, C. C. Concussion-Mild Traumatic Brain Injury: Recoverable Injury with Potential for Serious Sequelae. *Neurosurg Clin N Am*, 27, n. 4, p. 441-452, Oct 2016.

KAUR, P.; SHARMA, S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*, 16, n. 8, p. 1224-1238, 2018.

KEHREIN, K.; BONNEFOY, N.; OTT, M. Mitochondrial protein synthesis: efficiency and accuracy. *Antioxid Redox Signal*, 19, n. 16, p. 1928-1939, Dec 1 2013.

KHACHO, M.; CLARK, A.; SVOBODA, D. S.; MACLAURIN, J. G. et al. Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Hum Mol Genet*, 26, n. 17, p. 3327-3341, Sep 1 2017.

KOBEISSY, F. H.; LIU, M. C.; YANG, Z.; ZHANG, Z. et al. Degradation of betaII-Spectrin Protein by Calpain-2 and Caspase-3 Under Neurotoxic and Traumatic Brain Injury Conditions. *Mol Neurobiol*, 52, n. 1, p. 696-709, Aug 2015.

KULBE, J. R.; HALL, E. D. Chronic traumatic encephalopathy-integration of canonical traumatic brain injury secondary injury mechanisms with tau pathology. *Prog Neurobiol*, 158, p. 15-44, Nov 2017.

KULBE, J. R.; HILL, R. L.; SINGH, I. N.; WANG, J. A. et al. Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A. *J Neurotrauma*, 34, n. 7, p. 1291-1301, Apr 1 2017.

LAMADE, A. M.; KENNY, E. M.; ANTHONYMUTHU, T. S.; SOYSAL, E. et al. Aiming for the target: Mitochondrial drug delivery in traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, 145, n. Pt B, p. 209-219, Feb 2019.

LANGLOIS, J. A.; RUTLAND-BROWN, W.; WALD, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil*, 21, n. 5, p. 375-378, Sep-Oct 2006.

LAWRENCE, D. W.; HUTCHISON, M. Concerns with novel concussion protocol. *Br J Sports Med*, 51, n. 7, p. 620-621, Apr 2017.

LEVIN, H. S.; DIAZ-ARRASTIA, R. R. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury. *Lancet Neurol*, 14, n. 5, p. 506-517, May 2015.

LORENTE, L.; MARTIN, M. M.; ARGUESO, M.; RAMOS, L. et al. Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury. *BMC Neurol*, 15, p. 228, Nov 6 2015.

LUONGO, T. S.; LAMBERT, J. P.; GROSS, P.; NWOKEDI, M. et al. The mitochondrial Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger is essential for Ca⁽²⁺⁾ homeostasis and viability. *Nature*, 545, n. 7652, p. 93-97, May 4 2017.

MA, E. L.; SMITH, A. D.; DESAI, N.; CHEUNG, L. et al. Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun*, 66, p. 56-69, Nov 2017.

MANLEY, G.; GARDNER, A. J.; SCHNEIDER, K. J.; GUSKIEWICZ, K. M. et al. A systematic review of potential long-term effects of sport-related concussion. *Br J Sports Med*, 51, n. 12, p. 969-977, Jun 2017.

MAZZEO, A. T.; BEAT, A.; SINGH, A.; BULLOCK, M. R. The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Exp Neurol*, 218, n. 2, p. 363-370, Aug 2009.

MCCULLY, J. D.; COWAN, D. B.; EMANI, S. M.; DEL NIDO, P. J. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion*, 34, p. 127-134, May 2017.

MCFADYEN, B. J.; CANTIN, J. F.; SWAINE, B.; DUCHESNEAU, G. et al. Modality-specific, multitask locomotor deficits persist despite good recovery after a traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 90, n. 9, p. 1596-1606, Sep 2009.

MEANEY, D. F.; MORRISON, B.; DALE BASS, C. The mechanics of traumatic brain injury: a review of what we know and what we need to know for reducing its societal burden. *J Biomech Eng*, 136, n. 2, p. 021008, Feb 2014.

MILS, V.; BOSCH, S.; ROY, J.; BEL-VIALAR, S. et al. Mitochondrial reshaping accompanies neural differentiation in the developing spinal cord. *PLoS One*, 10, n. 5, p. e0128130, 2015.

MONTILLA-GARCIA, A.; TEJADA, M. A.; PERAZZOLI, G.; ENTRENA, J. M. et al. Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology*, 125, p. 231-242, Oct 2017.

MULLER, A. P.; HAAS, C. B.; CAMACHO-PEREIRA, J.; BROCHIER, A. W. et al. Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. *Exp Neurol*, 247, p. 66-72, Sep 2013.

NAKAJIMA, H.; ITAKURA, M.; KUBO, T.; KANESHIGE, A. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. *J Biol Chem*, 292, n. 11, p. 4727-4742, Mar 17 2017.

NAVIAUX, R. K. Metabolic features of the cell danger response. *Mitochondrion*, 16, p. 7-17, May 2014.

PACHALSKA, M.; MANKO, G.; CHANTSOULIS, M.; KNAPIK, H. et al. The quality of life of persons with TBI in the process of a comprehensive rehabilitation program. *Med Sci Monit*, 18, n. 7, p. Cr432-442, Jul 2012.

PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Jan 9 2019.

PORTELA, L. V.; GNOATTO, J.; BROCHIER, A. W.; HAAS, C. B. et al. Intracerebroventricular metformin decreases body weight but has pro-oxidant effects and decreases survival. *Neurochem Res*, 40, n. 3, p. 514-523, Mar 2015.

QIU, X.; SHI, L.; ZHUANG, H.; ZHANG, H. et al. Cerebrovascular Protective Effect of Boldine Against Neural Apoptosis via Inhibition of Mitochondrial Bax Translocation and Cytochrome C Release. *Med Sci Monit*, 23, p. 4109-4116, Aug 25 2017.

REFAKIS, C. A.; TURNER, C. D.; CAHILL, P. J. Sports-related Concussion in Children and Adolescents. *Clin Spine Surg*, 30, n. 5, p. 191-196, Jun 2017.

ROOME, R. B.; VANDERLUIT, J. L. Paw-dragging: a novel, sensitive analysis of the mouse cylinder test. *J Vis Exp*, n. 98, p. e52701, Apr 29 2015.

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

ROSENFELD, J. V.; MAAS, A. I.; BRAGGE, P.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C. et al. Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet*, 380, n. 9847, p. 1088-1098, Sep 22 2012.

RUBENSTEIN, R.; CHANG, B.; YUE, J. K.; CHIU, A. et al. Comparing Plasma Phospho Tau, Total Tau, and Phospho Tau-Total Tau Ratio as Acute and Chronic Traumatic Brain Injury Biomarkers. *JAMA Neurol*, 74, n. 9, p. 1063-1072, Sep 1 2017.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24, n. 10, p. R453-462, May 19 2014.

SHAKI, F.; SHAYESTE, Y.; KARAMI, M.; AKBARI, E. et al. The effect of epicatechin on oxidative stress and mitochondrial damage induced by homocysteine using isolated rat hippocampus mitochondria. *Res Pharm Sci*, 12, n. 2, p. 119-127, Apr 2017.

SHARMA, A.; LIAW, K.; SHARMA, R.; ZHANG, Z. et al. Targeting Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Activated Microglia using Dendrimer-Based Therapeutics. *Theranostics*, 8, n. 20, p. 5529-5547, 2018.

SHIN, B.; COWAN, D. B.; EMANI, S. M.; DEL NIDO, P. J. et al. Mitochondrial Transplantation in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*, 982, p. 595-619, 2017.

SIMS, N. R.; ANDERSON, M. F. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc*, 3, n. 7, p. 1228-1239, 2008.

SINGH, L.; PUSHKER, N.; SAINI, N.; SEN, S. et al. Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 43, n. 3, p. 259-267, Apr 2015.

STEENERSON, K.; STARLING, A. J. Pathophysiology of Sports-Related Concussion. *Neurol Clin*, 35, n. 3, p. 403-408, Aug 2017.

SUN, D.; CHEN, X.; GU, G.; WANG, J. et al. Potential Roles of Mitochondria-Associated ER Membranes (MAMs) in Traumatic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol*, 37, n. 8, p. 1349-1357, Nov 2017.

SUN, D. A.; DESHPANDE, L. S.; SOMBATI, S.; BARANOVA, A. et al. Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and

altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury. *Eur J Neurosci*, 27, n. 7, p. 1659-1672, Apr 2008.

SZARKA, N.; PABBIDI, M. R.; AMREIN, K.; CZEITER, E. et al. Traumatic Brain Injury Impairs Myogenic Constriction of Cerebral Arteries: Role of Mitochondria-Derived H₂O₂ and TRPV4-Dependent Activation of BK_{Ca} Channels. *J Neurotrauma*, Jan 12 2018.

VALLEE, M.; MCFADYEN, B. J.; SWAINE, B.; DOYON, J. et al. Effects of environmental demands on locomotion after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 87, n. 6, p. 806-813, Jun 2006.

WALENSKY, L. D. Targeting BAX to drug death directly. *Nat Chem Biol*, 15, n. 7, p. 657-665, Jul 2019.

WANG, K. K.; YANG, Z.; ZHU, T.; SHI, Y. et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn*, 18, n. 2, p. 165-180, Feb 2018.

WINKLER, E. A.; MINTER, D.; YUE, J. K.; MANLEY, G. T. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurg Clin N Am*, 27, n. 4, p. 473-488, Oct 2016.

ZHANG, Q.; ZHANG, M.; HUANG, X.; LIU, X. et al. Inhibition of cytoskeletal protein carbonylation may protect against oxidative damage in traumatic brain injury. *Exp Ther Med*, 12, n. 6, p. 4107-4112, Dec 2016.

ZHANG, X.; LI, Z.; ZHANG, Q.; CHEN, L. et al. Mechanisms Underlying H₂O₂-Evoked Carbonyl Modification of Cytoskeletal Protein and Axon Injury in PC-12 Cells. *Cell Physiol Biochem*, 48, n. 3, p. 1088-1098, 2018.

ZIMMER, E. R.; TORREZ, V. R.; KALININE, E.; AUGUSTIN, M. C. et al. Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, n. 219, 2015-June-03 2015. Original Research.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94, n. 3, p. 909-950, Jul 2014.