

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

Gustavo Cassol

**EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES EM RATOS JOVENS
SOBRE MECANISMOS RELACIONADOS A MEMÓRIA NA FASE
ADULTA**

**Santa Maria, RS
2017**

RESUMO

EFEITO DE CONCUSSÕES RECORRENTES EM RATOS JOVENS SOBRE MECANISMOS RELACIONADOS A MEMÓRIA NA FASE ADULTA

AUTOR: Gustavo Cassol

ORIENTADOR: Luiz Fernando Freire Royes

O traumatismo cranioencefálico (TCE) atinge milhões de pessoas anualmente, e grande parte da população atingida são jovens na fase da adolescência, na maioria das vezes acometidos pelo evento em esportes radicais e de contato. De fato, a concussão anteriormente era classificada como um TCE leve, mas, estudos relatam que ela tem identidade própria, ativando cascatas neuroquímicas similares a de doenças neurodegenerativas. Deste modo, mediadores inflamatórios produzidos pela constante ativação da micróglia, podem ativar cascatas de sinalizações que podem induzir a uma hiperfosforilação da principal proteína estabilizadora de microtubulos neuronais, a tau, ocasionando desestabilização nos mesmos e consequentemente, tornando inefetivo o transporte de várias moléculas ao longo do axônio, como é o caso do BDNF. Este por sua vez pode ter sua liberação comprometida na fenda sináptica, ocasionando em uma diminuição na transcrição do principal gene relacionado a memória CREB. Outra possível via afetada pelas concussões é a colinérgica, na qual a diminuição de seu neurotransmissor acetilcolina culmina na diminuição da via de ativação de CREB. Sabe-se da relação entre a o aumento da atividade da Acetilcolinesterase e a diminuição da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, ocasionando déficit cognitivo. Portanto, objetiva-se o entendimento destas vias para a elucidar os mecanismos relacionados a memória de ratos na fase adulta, acometidos por concussões recorrentes (CR) durante a fase jovem. Ratos wistar com 35 dias serão submetidos a sete CR com intervalo de 24 horas cada, sendo submetidos a testes comportamentais relacionados a cognição, ansiedade e déficit motor até sete dias e reavaliados novamente em até 40 dias após a última concussão. Deste modo, análises enzimáticas *ex-vivo* serão realizadas, bem como expressão das principais proteínas envolvidas na memória. Como resultados, espera-se que as CR ocasionem uma hiperfosforilação da tau, culminando em prejuízo cognitivo. Resultados prévios mostram déficit cognitivo na fase aguda, perdurando na idade adulta, bem como nenhum déficit motor. Portanto, o possível envolvimento de mediadores inflamatórios pode estar a contribuir neste dano de memória.

Palavras-chave: Concussão. Jovem. BDNF. Memória. Inflamação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representativo do modelo de concussão por *Weight Drop*.

Figura 2: Desenho experimental referente à comportamentos agudos, pós-concussões.

Figura 3: Desenho experimental referente à comportamentos crônicos, pós-concussões.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CDC	Centro de Controle de Doenças
CREB	Proteína Ligante ao Elemento de Resposta ao AMPc
ECG	Estaca de Coma de Glasgow
E-LTP	Potencialização de Longo Prazo Precoce
ERK	Quinase reguladora de sinalização extracelular
IL-1 β	Interleucina 1 beta
L-LTP	Potencialização de Longo Prazo Tardia
LTP	Potencialização de Longo Prazo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mBDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro Maduro
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Traumatismo Cranioencefálico
TCEL	Traumatismo Cranioencefálico Leve
TrkB	Tirosina Quinase B

Sumário

1. Introdução.....	2
2. Objetivos	8
Objetivo Geral	8
Objetivos específicos.....	8
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Animais	9
3.2 Indução de concussão por modelo de Weight Drop	9
3.3 Validação da Concussão.....	10
3.4 Tempo de inconsciência e Pesagem	10
3.5 Desenho Experimental.....	10
3.6 Avaliação da atividade locomotora e exploratória	11
3.6.1 Campo Aberto	11
3.6.2 Caixa de Atividades.....	11
3.6.3 Rotarod	12
3.7 Avaliação Comportamental	12
3.7.1 Reconhecimento de Objeto.....	12
3.7.2 Cruz Elevada.....	13
3.8 Análises <i>Ex-vivo</i>	13
3.8.1 Eletroforese.....	13
3.8.1.1 <i>Western Blotting</i>	13
3.8.2 Análises Bioquímicas	14
3.8.2.1 Acetilcolinesterase.....	14
3.8.2.2 Na ⁺ K ⁺ ATPase	14
3.8.2.3 Determinação proteica	14
3.9 Análise Estatística	14
4. Cronograma	15
5. Referências Bibliográficas	16

1. INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é classificado como uma alteração na função cerebral causada pela aplicação de uma força externa (MENON et al., 2010). Estudos epidemiológicos indicam que nos EUA aproximadamente 2.2 milhões de pessoas sofrem TCE anualmente (BARRIO et al., 2015), de acordo com o CDC (Center for Disease Control) foram gastos em 2010 aproximadamente U\$76.5 bilhões com TCE (FAUL e CORONADO, 2015). Anualmente, mais de 42 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por este evento, com elevada prevalência de morte entre crianças e jovens adultos (BAKER et al., 2008; GARDNER e YAFFE, 2015). Além disso, o número de crianças e adolescentes entre 0 e 14 anos que deram entrada em departamentos de emergência nos EUA após o TCE se aproxima de 500 mil pessoas entre os anos de 2002 e 2006 (CORONADO et al., 2012).

Corroborando com os dados acima, recentes estudos revelaram que cerca de 13,2 % dos alunos praticantes de esportes no ensino médio nos EUA são vítimas de concussões recorrentes e começam a apresentar sintomas comportamentais a longo prazo tais como: ansiedade, agressividade e memória (CASTILE et al., 2012; KONRAD et al., 2011). No Brasil, os homens são mais acometidos por TCE do que as mulheres (ELOIA et al., 2013), sendo que a maior parte das internações se concentra na região sudeste (43%). Indivíduos do sexo masculino representam 81,5% do total dos casos, sendo que 53% possui faixa etária entre 14-35 anos (FERNANDES, 2010). No Ceará, 87% dos registros por TCE na Santa Casa no período de 2010 a 2011 eram homens, sendo que 18,1% representavam a faixa etária entre 10 e 20 anos de idade (ELOIA et al., 2013). Paralelamente com esses dados, no pronto-socorro de Pelotas/RS, 44,3% das vítimas de TCE atingidas no período de um mês, tinham menos de 15 anos (SANTOS et al., 2013). Entretanto, no Brasil há uma carência de dados epidemiológicos a nível nacional que envolva o TCE e a população mais jovem.

Em relação a lesão ocasionada pelo TCE, pode-se dividir em duas fases, o dano primário, momento em que há lesão no encéfalo por movimento de aceleração/desaceleração ou fratura óssea, e o dano secundário, consequência do dano primário, englobando as cascatas neuroquímicas após o TCE, podendo ser vista em horas, dias e até mesmo anos após o evento. Quanto a classificação de gravidade do TCE, é comumente feita através de indicadores clínicos que avaliam o nível de consciência dos pacientes, um exemplo é a Escala de Coma de Glasgow (ECG), amplamente utilizada

imediatamente após o incidente (TEASDALE e JENNETT, 1974). O TCE é dividido em três categorias: grave, moderado e leve (SAATMAN et al., 2008). Até então, a concussão era classificada na categoria de TCE leve (TCEL), porém, sugere-se que ela tem identidade própria, e que não necessariamente, leve a perda da consciência e demonstre anormalidade no padrão estrutural de imagem, como as demais categorias, mas que pode resultar em uma cascata fisiopatológica complexa, principalmente na população mais jovem (GRAFF e CAPERELL, 2016; MCCRORY et al., 2013).

É válido ressaltar que há diferença nas características do cérebro de adultos e crianças, devido ao grau de mielinização diferenciado existente nas divergentes idades (SEMPLE et al., 2016). Além disso, mudanças na mielinização ao longo do tempo estão subjacentes a um aumento progressivo da substância branca no cérebro em desenvolvimento (GIEDD et al., 1999; TASKER, 2006). Nesse sentido, em adultos, a concussão ocasiona lesão axonal difusa, implicando em perturbações na membrana axonal, bem como a provável diminuição de mielina e atrofia da substância branca, podendo ser atribuída a lesão tardia. Em jovens e crianças, as lesões axonais difusas são normalmente atribuídas a esportes de contato, acometendo o cérebro durante uma fase de crescimento e mielinização ainda em fase de desenvolvimento, ocasionando diminuição na organização neuronal (EWING-COBBS et al., 2008; MCCRORY et al., 2013; TASKER, 2006).

A concussão, objeto de estudo do presente projeto, mostra grande incidência na população jovem, cerca de 32% do total dos casos de concussão ocorrem entre dez a dezenove anos de idade (ZHANG, A. L. et al., 2016). Neste contexto, pacientes jovens acometidos pela concussão podem apresentar uma interrupção em seu desenvolvimento normal, sendo uma das principais causas de incapacidade (FIDAN et al., 2016; MEEHAN e MANNIX, 2010; PULLELA et al., 2006; SCHNEIER et al., 2006)

Dentre as consequências da concussão, pode-se citar os prejuízos a longo prazo em habilidades cognitivas (déficit no funcionamento intelectual, atenção, memória, linguagem, habilidades visuais-espaciais e executivas) (MCCRORY et al., 2013). Neste contexto, o déficit cognitivo após a concussão é de extrema importância, visto que as alterações de memória podem estar presentes durante todo o desenvolver do quadro neurológico. Na fase inicial, após uma concussão, o paciente pode apresentar amnésia (CANTU, 1998; MCCRORY et al., 2013). Na fase crônica, as preocupações são normalmente associadas com o aumento da distração, comprometendo a atenção, memória de trabalho e recuperação de informações, ou seja, ocasionando dano cognitivo (FLYNN,

2010; MANNIX et al., 2014; QIN et al., 2016).

Além do dano cognitivo relacionado a piora da memória, bem relatado nos pacientes, a neuroinflamação crônica tem sido mostrada por influenciar nesse processo de retenção de informações (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017; LI et al., 2003; MOUZON et al., 2014). Desse modo, sugere-se que concussões recorrentes simulam respostas similares as vistas em um insulto de TCE moderado no cérebro no que diz respeito a neuroinflamação (FADEN et al., 2016). Em um cérebro saudável a micróglia funciona como um macrófago (KIERDORF e PRINZ, 2017). Ela tem uma variedade de funções no encéfalo, incluindo o reparo do sistema nervoso central (SNC) e a mediação da resposta imune contra infecções (KIERDORF e PRINZ, 2017). A microglia rapidamente se torna ativada em resposta ao dano no SNC. Dependendo da natureza do estímulo, a microglia pode levar uma série de estados de ativação, que correspondem a alteração da sua morfologia, expressão e função gênica (DONAT et al., 2017). Há evidências que a ativação precoce da microglia após o TCE pode contribuir para a restauração da homeostase no cérebro (DONAT et al., 2017). Por outro lado, ficando ativada de forma crônica, como em concussões recorrentes (CHERRY et al., 2016; FIDAN et al., 2016; MANNIX et al., 2014), permanecendo com o fenótipo amebóide denominado M1, liberando mediadores pró-inflamatórios dentre eles a citocina IL-1 β , que podem resultar em danos neuronais e contribuindo potencialmente para a neurodegeneração (DONAT et al., 2017); LOZANO et al. (2015); (MANNIX et al., 2014). Corroborando com essas afirmações, a IL-1 β vem sendo relacionada com a hiperfosforilação da proteína tau (p-tau) (LI et al., 2003; SHENG et al., 2000).

Em jogadores de esportes de contato que sofreram concussões recorrentes, ao longo da vida, é bem descrito o desenvolvimento da Encefalopatia traumática crônica (ETC), caracterizada pelo acúmulo de agregados da proteína fosfo-tau (p-tau) (HUBER et al., 2016; OMALU et al., 2010). A proteína tau frequentemente promove ciclos de afastamento e ligação (sendo fosforilada e desfosforilada), nos microtúbulos axonais, que são necessários para a estabilização dos mesmos e posterior transporte axonal efetivo (TERWEL et al., 2002). Em contraponto, uma vez hiperfosforilada, a proteína p-tau forma aglomerados da própria proteína, o que gera significativa desestabilização dos microtúbulos e por consequência, compromete o transporte axonal entre o soma e a sinapse (BUNKER et al., 2004; HANGER et al., 2009; LINDWALL e COLE, 1984; MEDINA et al., 2016). Dentre as diversas formas de fosforilação da proteína tau, experimentos em cultura de

neurônios demonstraram que a IL-1 β mas não TNF- α desempenha papel chave nesse processo, onde a hiperfosforilação da tau é supostamente mediada pela proteína quinase ativada por mitogeno (p38 MAPK) (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017; LI et al., 2003; SHENG et al., 2000).

Levando em consideração essas informações, sabe-se que diversas moléculas são dependentes de um transporte axonal efetivo até o seu local de liberação, são elas: moléculas de sinalização, constituintes celulares e fatores tróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BALLATORE et al., 2007).

O BDNF é uma neurotrofina essencial em processos neurofisiológicos e está envolvido na síntese e formação de proteínas dendríticas, além disso, a sua via de sinalização é de fundamental importância, visto que está bem relacionada com mecanismos de formação de memória e cognição (BRAMHAM e MESSAOUDI, 2005; BRAMHAM et al., 1996; FOLTRAN e DIAZ, 2016; HELDT et al., 2007; KANG et al., 1996; MESSAOUDI et al., 1998; REICHARDT, 2006; SASI et al., 2017; SOULE et al., 2006; SUZUKI et al., 2011; TAO et al., 1998). Para isso, o BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático como pre-pro-BDNF, que é então clivado a pro-BDNF, sendo transportado para o complexo de Golgi para separação em vesículas secretoras, onde pode ser convertido em BDNF maduro (mBDNF) intracelularmente no trans-Golgi (GREENBERG et al., 2009; LEAL et al., 2017). Há evidências que, após a incorporação do BDNF em vesículas, as mesmas podem ser transportadas por proteínas associadas aos microtúbulos, para os neuritos de neurônios hipocámpais (PARK et al., 2008). Sob estímulo de influxo de íons Ca²⁺, o mBDNF é liberado na fenda sináptica (HARTMANN et al., 2001; MATSUDA et al., 2009), ligando-se em seu receptor tirosina kinase B (TrkB), levando a autofosforilação de seus resíduos de tirosina no domínio intracelular e subsequente ativação de vias relacionadas a ERK, fosfolipase C- γ e fosfatidilinositol 3-quinase (MIZUNO et al., 2003; REICHARDT, 2006). Estas vias regulam a fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), ativando a transcrição de genes envolvidos na consolidação da memória.

De fato, o mBDNF é descrito por promover vias de sinalização que regulam a transcrição de genes que estão envolvidas na plasticidade sináptica, aumentando a potencialização de longo prazo (LTP) (LU, 2003; MINICHELLO, 2009; POO, 2001; THOENEN, 2000). A LTP consiste em fases distintas envolvendo complexos mecanismos moleculares, onde a fase inicial (E-LTP) dura entre 2 e 3 horas, e a fase tardia (L-LTP), dura várias horas, dias e semanas, requerendo síntese de novas proteínas, assim a LTP tem sido

identificada como a primeira candidata a mediar mudanças na memória (LYNCH, 2004). Levando estes fatores em conjunto, um transporte axonal inefetivo, contribuirá para a diminuição da liberação de BDNF e consequente diminuição da sua interação com seu receptor TrkB no neurônio pós-sináptico, ocasionando prejuízos na plasticidade sináptica, inibição da arborização dendrítica e por fim déficit cognitivo após as concussões recorrentes (BALLATORE et al., 2007; GAO et al., 2009; PARK et al., 2008).

Além dos efeitos bem relatados do BDNF sobre processos cognitivos, o sistema colinérgico tem sido mostrado por também desempenhar um papel de extrema importância na transcrição de genes relacionados a memória. A acetilcolina (ACh), neurotransmissor do sistema colinérgico, se liga a receptores muscarínicos e nicotínicos, realizando importante papel sobre a memória, através de cascatas de fosforilação, que levam ao aumento de sínteses proteica e transcrição de genes relacionadas a cognição, como CREB (ALREJA et al., 2000; CAREY et al., 2001; DUNNETT et al., 1987; FELDER, 1995; RIEDEL, 2004; SHAYWITZ e GREENBERG, 1999; SUGISAKI et al., 2011; TIETJE et al., 1990; VERMA et al., 2009). Estudos mostram que o bloqueio dos receptores muscarínicos pela escopolamina induz déficit cognitivo similar ao observado na doença de Alzheimer (BARTUS et al., 1982; RIEDEL, 2004). Paralelamente com estes dados, estudos mostram que o aumento da atividade da AChE está associado com uma diminuição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ sobre comportamento cognitivo em doenças neurodegenerativas, bem como diminuição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ após 3 meses do dano em modelo de TCE (KREUTZ et al., 2013; LIMA et al., 2008; ZHANG, L. N. et al., 2013).

A enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, uma proteína de membrana, é responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso, ação e captação de neurotransmissores no cérebro (SKOU, 1988; STAHL e HARRIS, 1986), ela sofre uma transição conformacional onde três íons Na^+ saem da região intracelular para a extracelular. A este passo, a enzima perde a afinidade com o íon Na^+ e se liga em dois íons de K^+ , transportando-os do meio extracelular para o intracelular repolarizando as células (JORGENSEN et al., 2003; SKOU, 1988). Recentes estudos sugerem que a diminuição desta enzima após 3 meses do TCE, pode estar associada com o déficit cognitivo (LIMA et al., 2008; SHIN e DIXON, 2015a;2015b; ZAFONTE et al., 2012).

Consequentemente, jovens praticantes de esportes de contato estão relacionados com o acometimento de concussões recorrentes (CASTILE et al., 2012). Desse modo, a inflamação crônica ocasionada pela concussão, tem sido associada com os danos em estruturas proteicas

que fazem parte do citoesqueleto nas células neuronais, os microtúbulos (COLLINS-PRAINO e CORRIGAN, 2017). Levando em consideração que, concussões recorrentes podem ocasionar uma hiperfosforilação da proteína tau, desestabilizando os microtúbulos neuronais gerando prejuízo no transporte de neurotrofinas e fatores de transcrição como o BDNF e CREB (BALLATORE et al., 2007; DU et al., 2016; KANE et al., 2012; LUO et al., 2014; MANNIX et al., 2014; PARK et al., 2008; PETRAGLIA et al., 2014). Neste contexto, o sistema colinérgico pode estar comprometido, devido ao aumento da atividade da AChE e como consequência diminuição da ACh, minimizando outras cascatas envolvidas na fosforilação de CREB (DRACHMAN, 1977; SHIN e DIXON, 2015b; SUGISAKI et al., 2011). Estudos relacionam a piora da memória com aumento da AChE seguido por diminuição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na doença de Alzheimer, bem como essa diminuição é vista três meses após um simples episódio de TCE (KREUTZ et al., 2013; LIMA et al., 2008). Portanto, a concussão pode ocasionar déficit cognitivo por mudanças proteicas no citoesqueleto de neurônios hipocampus, bem como irregular balanço enzimático, contribuindo para a não fosforilação do principal fator de transcrição, o CREB. Diante disso, este modelo experimental de concussão recorrente em ratos jovens com seus efeitos na fase adulta, possibilitará um melhor entendimento das alterações neuroquímicas relacionadas ao mecanismo inflamatório e de memória na fase adulta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito crônico de concussões recorrentes em ratos jovens sobre mecanismos relacionados a memória e o envolvimento da inflamação sobre estas vias na fase adulta.

2.2 Objetivos Específicos

- A) Avaliar os parâmetros comportamentais relacionados a memória e ansiedade;
- B) Investigar se as concussões recorrentes ocasionam déficit motor;
- C) Analisar o peso e tempo de inconsciência dos animais durante o período de concussões;
- D) Investigar se esse modelo de concussão recorrente ativa a micróglia na sua forma ameboide, bem como a expressão de IL-1 β , seu principal produto;
- E) Analisar a expressão de proteínas relacionadas a memória, tais como BDNF, TrkB, p38 MAPK, ERK e CREB;
- F) Verificar a expressão da proteína p-tau;
- G) Determinar o envolvimento das enzimas Na⁺K⁺ATPase e AChE sobre mecanismos de memória;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Serão utilizados ratos Wistar jovens machos (35 dias), quais serão mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7h00 e 19h00), em temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, com ração comercial e água *ad libitum*. Serão alojados em caixas de polipropileno de 41x34x16 cm, qual possuem estrutura forte, com superfícies internas regulares, de fácil limpeza, resistente a água quente, detergentes e desinfetantes. Com higiene controlada e prevenção de superlotação mantendo no máximo quatro animais por caixa. Os animais serão divididos em dois grupos, um grupo Sham (controle) e outro grupo concussão. Projeto registrado no CEUA UFSM sob número 3740020616.

3.2 INDUÇÃO DE CONCUSSÃO POR MODELO DE *WEIGHT DROP*

O modelo de concussão recorrente será feito pelo modelo de *Weight Drop* desenvolvido em nosso laboratório, conforme (MANNIX et al., 2017; MARMAROU et al., 1994), com algumas modificações, utilizando peso de 54g e altura de 71,1 cm. Os animais serão anestesiados com Isoflurano 2% e em seguida serão submetidos ao processo de concussão, após o contato do peso e o crânio do animal, o roedor sofrerá um impacto que culminará em uma aceleração repentina de seu corpo, girando 180° e caindo na espuma da caixa acrílica, ocasionando uma concussão por aceleração/desaceleração. Antes da indução de cada concussão, será aplicado lidocaína tópica na cabeça dos animais para minimizar a dor pós-traumática (MYCHASIUK et al., 2014). As concussões serão recorrentes durante sete dias seguidos, com dois dias de recuperação pós-traumática para animais serem submetidos aos testes comportamentais. O presente protocolo de concussão totalizará nove dias. Após cada dia da concussão, os animais serão alojados em uma caixa limpa para recuperação em uma sala aquecida, evitando possível hipotermia. Os animais controle passarão pelo mesmo processo, exceto a concussão.

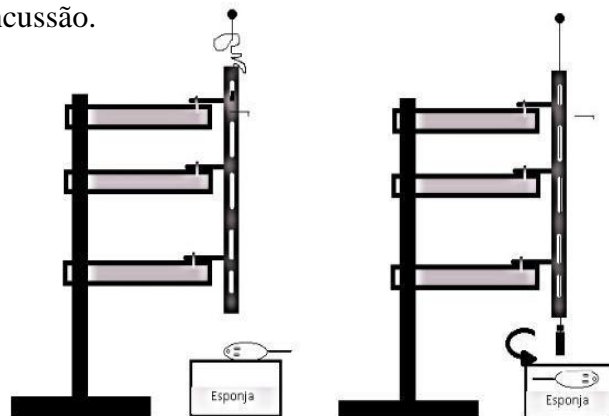


Figura 1. Modelo de *Weight Drop*
(fonte: Cassol, G., 2016)

3.3 VALIDAÇÃO DA CONCUSSÃO

Uma das formas de caracterizar a concussão é através do monitoramento do tempo de inconsciência do animal após concussão (imediatamente após a concussão). Ele é associado com o sintoma de concussão e presença de um TCE (MYCHASIUK et al., 2014)

3.4 TEMPO DE INCONSCIÊNCIA E PESAGEM

Imediatamente após cada concussão os animais serão colocados em um lugar limpo para recuperação em posição de supinação. A latência que o animal demorar para sair da posição de supinação e voltar para a posição de pronação será cronometrado (MYCHASIUK et al., 2014).

Todos os animais serão pesados diariamente do P33 ao P41, para mostrar que as concussões não prejudicam o ganho de peso destes animais.

3.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Primeiramente os animais serão submetidos à dois testes pré-concussão, teste do campo aberto e rotarod para avaliação da atividade locomotora. Após animais serão divididos em dois grupos: I – Sham e II- concussão, sendo que os animais do grupo sham passarão por todos os procedimentos, exceto as concussões. Os animais do grupo concussão receberão sete concussões, uma por dia durante sete dias consecutivos com intervalo de 24 horas cada. Após os animais permanecerão dois dias de repouso, para serem submetidos a bateria de testes comportamentais citada abaixo.

No terceiro dia após a última concussão, será dado início a uma nova sequência de testes comportamentais que incluem: teste do campo aberto, caixa de atividades, teste do reconhecimento do objeto (RO), teste de labirinto em cruz elevada e Rotarod, para avaliar o efeito agudo das concussões recorrentes sobre parâmetros locomotores, cognitivos e ansiedade, conforme o desenho experimental na figura 2.

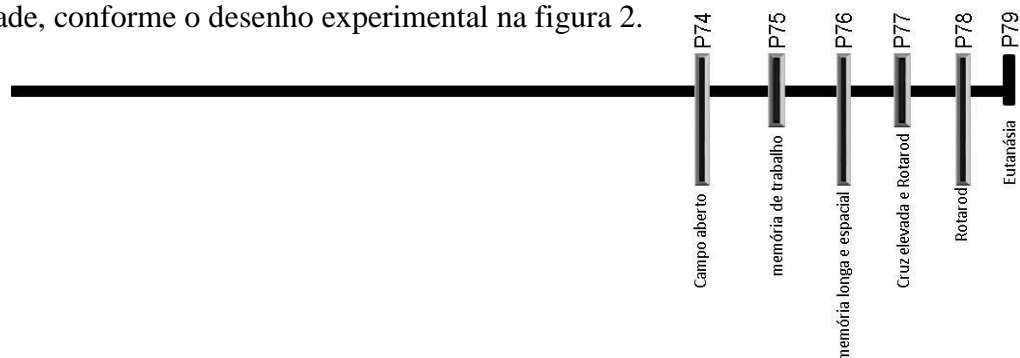


Figura 2. Desenho Experimental referente as avaliações comportamentais após as concussões recorrentes durante a fase jovem dos animais.

Para avaliar o efeito das concussões recorrentes trinta e dois dias após a última concussão, os mesmos animais submetidos as concussões recorrentes serão novamente avaliados através dos mesmos testes comportamentais: teste do campo aberto, caixa de atividades, teste do reconhecimento do objeto (RO), teste da Cruz elevada e Rotarod, na mesma sequência anteriormente descrita, seguido de eutanásia no dia posterior ao último teste.

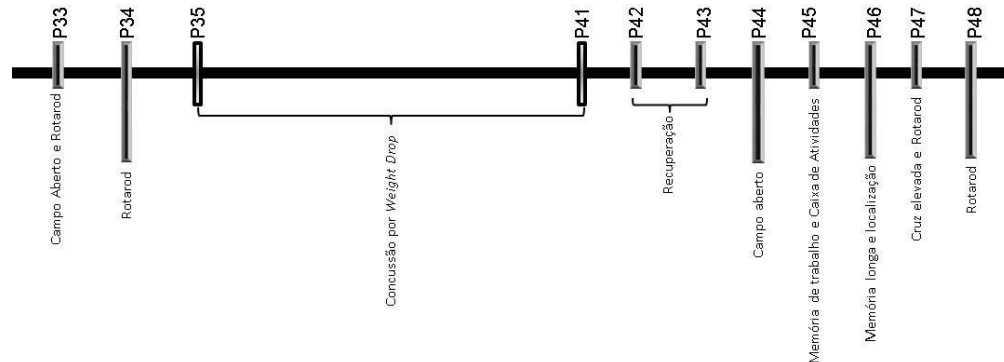


Figura 2. Desenho Experimental referente as avaliações comportamentais durante a fase adulta dos animais, acometidos pelas concussões na fase jovem.

Após cada animal ser submetido a determinado teste, os objetos e o ambiente serão limpos com álcool 10%. Antes de cada teste os roedores serão deixados ambientando na respectiva sala no mínimo uma hora antes de dar início aos testes comportamentais.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

3.6.1 Campo Aberto

Os animais serão colocados na área central de um campo aberto quadrado, que tem seu chão dividido em 9 áreas iguais. O número de passagem por quadrante (cruzamentos), bem como o número de respostas exploratórias dos animais (ficar sobre as patas traseiras) será registrado durante 5 minutos. No seu conjunto, estes parâmetros servirão para avaliar a atividade locomotora espontânea (PIETA DIAS et al., 2007).

3.6.2 Caixa de Atividades

A atividade locomotora será monitorada sob condições de luz e som diminuídos. O ensaio se deu em uma caixa de acrílico transparente (500x480x500mm) equipada com 16 sensores infravermelhos para a gravação automática da atividade horizontal (Modelo EP149, Insight Instrumentos LTDA, São Paulo, Brasil). Cada animal será inicialmente colocado no centro da caixa, permitindo sua mobilidade livre, sendo monitorado pelo sistema automatizado da caixa. Os dados (distância percorrida e velocidade) serão recolhidos e registrados durante 4 minutos.

3.6.3 RotaRod

O teste consiste em dois treinos de cinco minutos com intervalo de 24 horas para o teste. A sessão de treino tem 10 tentativas e terminará quando o animal cair do rotarod (3,7cm de diâmetro, velocidade de 8 rpm constante) ou depois de ter atingido o tempo de corte de 60 s. Será concedido um tempo de repouso de 60 s entre cada tentativa. Na sessão de teste de dois ensaios de 300s cada um, será realizado com um intervalo de 180s entre os ensaios (WHISHAW et al., 2003).

3.7 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.7.1 Reconhecimento de objeto

O treino na tarefa de reconhecimento de objeto terá como lugar a mesma arena utilizada para o teste de campo aberto. O teste de campo aberto será assim utilizado como uma habituação para o teste de reconhecimento de objeto. O teste de reconhecimento de objeto requer que os ratos lembrem de dois objetos de plástico que serão previamente familiarizados com o ambiente em que será realizado o teste, como previamente descrito (DE LIMA et al., 2005). Vinte e quatro horas depois exploração arena, o treinamento será realizado colocando ratos individualmente no campo, em que dois objetos idênticos (objetos A1 e A2; brinquedos Lego). Serão posicionados em dois cantos adjacentes, 9 cm das paredes. Os animais serão deixados para explorar os objetos até fechar 5 minutos. Em uma memória de curto prazo (MCP) o teste será feito 1,5 horas após formação, os ratos explorarão o campo aberto durante 5 min na presença de um familiarizado (A) e um novo objeto (B) (Figura 4). Todos os objetos terão semelhante texturas, cores e tamanhos, mas formas distintas. Um índice de reconhecimento calculada para cada animal será expressa pela relação de $TB/(TA+TB)$ [TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto para explorar o objeto B]. Entre ensaios os objetos serão lavados com uma solução de etanol a 10%. Em uma memória de longo prazo (MLP) o teste será feito 24 h após o treino, os mesmos ratos explorarão a arena durante 5 min na presença do objeto familiar A e um novo objeto C. O reconhecimento de objeto será avaliado como teste de memória de curto prazo. O tempo de intervalo para os testes MCP e MLP foi escolhido com base em estudos anteriores que caracterizam as vias neuroquímicas que medeiam a formação de MCP e MLP para reconhecimento de objetos (DE LIMA et al., 2005) e outras tarefas em ratos (QUEVEDO et al., 2004). Também será avaliado a memória de localização (LOC). A exploração de objetos pelo animal é tradicionalmente definida como aproximação da cabeça ao objeto a uma curta distância. A exploração será definida como cheirar ou tocar no objeto com o nariz e/ou patas

dianteadas. A maior exploração do novo objeto representa que o animal lembra que havia outro objeto naquele lugar.

3.7.2 Cruz elevada

Este teste tem sido amplamente validado para medir a ansiedade em roedores (PELLOW et al., 1985). O aparelho de labirinto em cruz elevado consiste de braços (comprimento: 50 cm, largura: 10 cm, altura do chão: 50 cm) em uma forma em forma de cruz e uma região central (10 cm²). Dois dos braços serão fechados em três lados por paredes (altura: 50 cm), ao passo que o outros dois não serão. Os braços fechados ou abertos do labirinto ficam de frente entre si. O labirinto é iluminado por uma luz fraca colocado acima da plataforma central. Cada rato será colocado no centro do labirinto de frente para um dos os braços abertos e o número de entradas, o tempo gasto nos braços abertos e o número de mergulhos serão registados em vídeo (usando uma webcan) por um período de teste de 5 min.

3.8 ANÁLISES *EX-VIVO*

3.8.1 Eletroforese

3.8.1.1 Western blotting

Com intuito de verificar o mecanismo relacionado com a memória de ratos adultos, acometidos por concussões recorrentes na fase jovem, análises de Western Blotting serão realizado de acordo com (GERBATIN et al., 2016), com algumas modificações. O tecido será homogeneizado a 4°C em tampão de lise. Após determinação da proteína total, será adicionado B-mercaptoetanol e em seguida as amostras serão congeladas a -80°C para posterior análise. As proteínas serão separadas por gel de eletroforese SDS-poliacrilamida (10%) e então as membranas serão coradas com Ponceau (0,1%), que servirá como controle da transferência. Cada membrana será bloqueada com albumina de soro bovino (BSA, 5%) em TBS-T por 1h. Em seguida, as membranas serão incubadas à 4°C por 12h com anticorpos primários específicos para a determinação das proteínas (BDNF, TrkB, CREB, P-CREB, IBA1, IL-1 β , MAPK, ERK, AT8 e β -actina). Após, as membranas serão incubadas com anticorpo secundário em TBS-T contendo BSA por 1h. Por último, as membranas serão levadas ao fotodocumentador (Carestream Molecular imaging – Gel Logic 6000 PRO) para a captura da luminescência produzida pelo ECL (Pierce).

3.8.2 Análises Bioquímicas

3.8.2.1 Acetilcolinesterase

A Atividade da AchE será feita de acordo com o método de (Ellman et al., 1961). O tecido será homogeneizado em tampão Medium I (0.32 M sacarose, 5 mM Tris-HCl e 0.1 mM EDTA) (1:10; w/v), e centrifugados em $2400 \times g$ por 10 min para obtenção do sobrenadante. O homogenato (100uL) será incubado em 1mL do Sistema (solução contendo 10 mM 5,5-ditiobis (2-dinitrobenzoic) acid (DTNB) (dissolvido em Tampão fosfato de potássio pH 7.0), 100 mM Tampão fosfato de potássio pH 7.5) e água (700 µl) por 2 min a 25 °C. Depois será pipetado 200uL de Acetilcolina iodada (8 mM) no tubo. A atividade da AChE será lida a uma espectofotometria de 412nm e expressada em nmol/hora/mg proteína (Wilhelm et al., 2010)

3.8.2.2 Na⁺K⁺ATPase

A atividade da Na⁺K⁺ATPase será realizada de acordo com o método descrito por (RAMBO et al., 2013) com algumas modificações. Será pipetado uma mistura contendo TrisHCl pH 7,4 com Na⁺, K⁺, Mg e EDTA (200mM), amostra 10uG de proteína, nos poços da inibição da enzima será pipetado ouabaína 8mM. Em seguida, a placa será pré-incubada em banho maria a 37^a, após fechar este período, iniciará a reação com ATP 12mM por 20 minutos, finalizando a reação com ácido tricloroacético 70%. A reação será lida por método colorimétrico utilizando molibdato 50mM diluído em H₂SO₄ 6N para captação de fosfato inorgânico e para reação de cor será utilizado ácido ascórbico 8%, por fim será lida a 620nm. O volume final da reação é de 150uL.

3.8.2.3 Determinação proteica

O método de determinação proteica será realizado de acordo com (BRADFORD, 1976) utilizando como padrão proteína do soro bovino (1mg/mL).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais serão avaliados utilizando o teste T de Student e quando necessário, ANOVA de 1 via. Valores significativos serão apresentados quando *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001, ****p<0,0001. O software utilizado será o GraphPad Prism versão 6.00.

4. CRONOGRAMA

2016/2	2017/1	2017/2	2018/1
Revisão de Literatura	Revisão de Literatura	Análises comportamentais	Análises de eletroforese e bioquímicas
Análises comportamentais		Análises de eletroforese e bioquímicas	Escrita de artigo e dissertação

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALREJA, M. et al. Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory. **J Neurosci**, v. 20, n. 21, p. 8103-10, Nov 01 2000.

BAKER, A. J. et al. Effects of resuscitation fluid on neurologic physiology after cerebral trauma and hemorrhage. **J Trauma**, v. 64, n. 2, p. 348-57, Feb 2008.

BALLATORE, C. et al. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 9, p. 663-72, Sep 2007.

BARRIO, J. R. et al. In vivo characterization of chronic traumatic encephalopathy using [F-18]FDDNP PET brain imaging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 16, p. E2039-47, Apr 21 2015.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-14, Jul 30 1982.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 07 1976.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 99-125, Jun 2005.

BRAMHAM, C. R. et al. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. **J Comp Neurol**, v. 368, n. 3, p. 371-82, May 06 1996.

BUNKER, J. M. et al. Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 6, p. 2720-8, Jun 2004.

CANTU, R. C. Second-impact syndrome. **Clin Sports Med**, v. 17, n. 1, p. 37-44, Jan 1998.

CAREY, G. J. et al. SCH57790, a selective muscarinic M(2) receptor antagonist, releases acetylcholine and produces cognitive enhancement in laboratory animals. **Eur J Pharmacol**, v. 431, n. 2, p. 189-200, Nov 16 2001.

CASTILE, L. et al. The epidemiology of new versus recurrent sports concussions among high school athletes, 2005-2010. **Br J Sports Med**, v. 46, n. 8, p. 603-10, Jun 2012.

CHERRY, J. D. et al. Microglial neuroinflammation contributes to tau accumulation in chronic traumatic encephalopathy. **Acta Neuropathol Commun**, v. 4, n. 1, p. 112, Oct 28 2016.

COLLINS-PRAINO, L. E.; CORRIGAN, F. Does neuroinflammation drive the relationship between tau hyperphosphorylation and dementia development following traumatic brain injury? **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 369-382, Feb 2017.

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

DE LIMA, M. N. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 6, p. 506-11, Jun 2005.

DONAT, C. K. et al. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. **Front Aging Neurosci**, v. 9, p. 208, 2017.

DRACHMAN, D. A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? **Neurology**, v. 27, n. 8, p. 783-90, Aug 1977.

DU, X. et al. Ameliorative Effects of Antioxidants on the Hippocampal Accumulation of Pathologic Tau in a Rat Model of Blast-Induced Traumatic Brain Injury. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 4159357, 2016.

DUNNETT, S. B. et al. Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. **Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 653-69, Feb 1987.

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

EWING-COBBS, L. et al. Arrested development and disrupted callosal microstructure following pediatric traumatic brain injury: relation to neurobehavioral outcomes. **Neuroimage**, v. 42, n. 4, p. 1305-15, Oct 01 2008.

FADEN, A. I. et al. Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 4, p. 681-91, Feb 2016.

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

FELDER, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. **FASEB J**, v. 9, n. 8, p. 619-25, May 1995.

FERNANDES, R. N. R. Análise epidemiológica das hospitalizações no Sistema Único de Saúde, por traumatismo crânio encefálico. Brasil:2001-2007. 2010.

FIDAN, E. et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in the Developing Brain: Effects on Long-Term Functional Outcome and Neuropathology. **J Neurotrauma**, v. 33, n. 7, p. 641-51, Apr 01 2016.

FLYNN, F. G. Memory impairment after mild traumatic brain injury. **Continuum (Minneap Minn)**, v. 16, n. 6 Traumatic Brain Injury, p. 79-109, Dec 2010.

FOLTRAN, R. B.; DIAZ, S. L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? **J Neurochem**, v. 138, n. 2, p. 204-21, Jul 2016.

GAO, X. et al. Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling. **Exp Neurol**, v. 215, n. 1, p. 178-90, Jan 2009.

GARDNER, R. C.; YAFFE, K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. **Mol Cell Neurosci**, v. 66, n. Pt B, p. 75-80, May 2015.

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

GIEDD, J. N. et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 861-3, Oct 1999.

GRAFF, D. M.; CAPERELL, K. S. Concussion Management in the Classroom. **J Child Neurol**, v. 31, n. 14, p. 1569-1574, Dec 2016.

GREENBERG, M. E. et al. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12764-7, Oct 14 2009.

HANGER, D. P. et al. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. **Trends Mol Med**, v. 15, n. 3, p. 112-9, Mar 2009.

HARTMANN, M. et al. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. **EMBO J**, v. 20, n. 21, p. 5887-97, Nov 01 2001.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-70, Jul 2007.

HUBER, B. R. et al. Potential Long-Term Consequences of Concussive and Subconcussive Injury. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 27, n. 2, p. 503-11, May 2016.

JORGENSEN, P. L. et al. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 817-49, 2003.

KANE, M. J. et al. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. **J Neurosci Methods**, v. 203, n. 1, p. 41-9, Jan 15 2012.

KANG, H. et al. Determinants of BDNF-induced hippocampal synaptic plasticity: role of the Trk B receptor and the kinetics of neurotrophin delivery. **Learn Mem**, v. 3, n. 2-3, p. 188-96, Sep-Oct 1996.

KIERDORF, K.; PRINZ, M. Microglia in steady state. **J Clin Invest**, Jul 17 2017.

KONRAD, C. et al. Long-term cognitive and emotional consequences of mild traumatic brain injury. **Psychol Med**, v. 41, n. 6, p. 1197-211, Jun 2011.

KREUTZ, F. et al. Alterations on Na(+),K(+)-ATPase and acetylcholinesterase activities induced by amyloid-beta peptide in rat brain and GM1 ganglioside neuroprotective action. **Neurochem Res**, v. 38, n. 11, p. 2342-50, Nov 2013.

LEAL, G. et al. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm**, v. 104, p. 153-195, 2017.

LI, Y. et al. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. **J Neurosci**, v. 23, n. 5, p. 1605-11, Mar 01 2003.

LIMA, F. D. et al. Na⁺,K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. **Behav Brain Res**, v. 193, n. 2, p. 306-10, Nov 21 2008.

LINDWALL, G.; COLE, R. D. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. **J Biol Chem**, v. 259, n. 8, p. 5301-5, Apr 25 1984.

LOZANO, D. et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 11, p. 97-106, 2015.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learn Mem**, v. 10, n. 2, p. 86-98, Mar-Apr 2003.

LUO, J. et al. Long-term cognitive impairments and pathological alterations in a mouse model of repetitive mild traumatic brain injury. **Front Neurol**, v. 5, p. 12, 2014.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 87-136, Jan 2004.

MANNIX, R. et al. Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. **J Neurosurg**, v. 121, n. 6, p. 1342-50, Dec 2014.

MANNIX, R. et al. Adolescent Mice Demonstrate a Distinct Pattern of Injury after Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**, v. 34, n. 2, p. 495-504, Jan 15 2017.

MARMAROU, A. et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. **J Neurosurg**, v. 80, n. 2, p. 291-300, Feb 1994.

MATSUDA, N. et al. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. **J Neurosci**, v. 29, n. 45, p. 14185-98, Nov 11 2009.

MCCRORY, P. et al. Consensus statement on Concussion in Sport - The 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. **Phys Ther Sport**, v. 14, n. 2, p. e1-e13, May 2013.

MEDINA, M. et al. New Features about Tau Function and Dysfunction. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, Apr 19 2016.

MEEHAN, W. P., 3RD; MANNIX, R. Pediatric concussions in United States emergency departments in the years 2002 to 2006. **J Pediatr**, v. 157, n. 6, p. 889-93, Dec 2010.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 11, p. 1637-40, Nov 2010.

MESSAOUDI, E. et al. Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. **J Neurophysiol**, v. 79, n. 1, p. 496-9, Jan 1998.

MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 850-60, Dec 2009.

MIZUNO, M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 2, p. 217-24, Feb 2003.

MOUZON, B. C. et al. Chronic neuropathological and neurobehavioral changes in a repetitive mild traumatic brain injury model. **Ann Neurol**, v. 75, n. 2, p. 241-54, Feb 2014.

MYCHASIUK, R. et al. Assessment of an experimental rodent model of pediatric mild traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 31, n. 8, p. 749-57, Apr 15 2014.

OMALU, B. I. et al. Chronic traumatic encephalopathy (CTE) in a National Football League Player: Case report and emerging medicolegal practice questions. **J Forensic Nurs**, v. 6, n. 1, p. 40-6, Spring 2010.

PARK, J. J. et al. A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**, v. 39, n. 1, p. 63-73, Sep 2008.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PETRAGLIA, A. L. et al. The pathophysiology underlying repetitive mild traumatic brain injury in a novel mouse model of chronic traumatic encephalopathy. **Surg Neurol Int**, v. 5, p. 184, 2014.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.

PULLELA, R. et al. Traumatic injury to the immature brain results in progressive neuronal loss, hyperactivity and delayed cognitive impairments. **Dev Neurosci**, v. 28, n. 4-5, p. 396-409, 2006.

QIN, Y. et al. Brain structure alterations and cognitive impairment following repetitive mild head impact: An in vivo MRI and behavioral study in rat. **Behav Brain Res**, Aug 04 2016.

QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 2, p. 339-43, Oct 05 2004.

RAMBO, L. M. et al. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylene-tetrazol-induced seizures. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 857-68, Mar 2013.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, Sep 29 2006.

RIEDEL, G. **From messengers to molecules: Memories are made of these.** Springer Science & Business Media, 2004. ISBN 0306478625.

SAATMAN, K. E. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 719-38, Jul 2008.

SANTOS, F. D. et al. Traumatismo Cranioencefálico: causas e perfil das vítimas atendidas no pronto-socorro de Pelotas/Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 882-893, 2013.

SASI, M. et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. **Pflugers Arch**, v. 469, n. 5-6, p. 593-610, Jun 2017.

SCHNEIER, A. J. et al. Incidence of pediatric traumatic brain injury and associated hospital resource utilization in the United States. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 483-92, Aug 2006.

SEMPLE, B. D. et al. Pediatric Rodent Models of Traumatic Brain Injury. **Methods Mol Biol**, v. 1462, p. 325-43, 2016.

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 821-61, 1999.

SHENG, J. G. et al. Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. **Exp Neurol**, v. 163, n. 2, p. 388-91, Jun 2000.

SHIN, S. S.; DIXON, C. E. Alterations in Cholinergic Pathways and Therapeutic Strategies Targeting Cholinergic System after Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**, v. 32, n. 19, p. 1429-40, Oct 01 2015a.

_____. Targeting alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: a future potential for neuroprotection from traumatic brain injury. **Neural Regen Res**, v. 10, n. 10, p. 1552-4, Oct 2015b.

SKOU, J. C. The Na,K-pump. **Methods Enzymol**, v. 156, p. 1-25, 1988.

SOULE, J. et al. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 4, p. 600-4, Aug 2006.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol**, v. 44, p. 681-93, 1986.

SUGISAKI, E. et al. Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network. **Neuroscience**, v. 192, p. 91-101, Sep 29 2011.

SUZUKI, A. et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **J Neurosci**, v. 31, n. 24, p. 8786-802, Jun 15 2011.

TAO, X. et al. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 709-26, Apr 1998.

TASKER, R. C. Changes in white matter late after severe traumatic brain injury in childhood. **Dev Neurosci**, v. 28, n. 4-5, p. 302-8, 2006.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-4, Jul 13 1974.

TERWEL, D. et al. Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neuromolecular Med**, v. 2, n. 2, p. 151-65, 2002.

THOENEN, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. **Prog Brain Res**, v. 128, p. 183-91, 2000.

TIETJE, K. M. et al. Cloning and functional analysis of a gene encoding a novel muscarinic acetylcholine receptor expressed in chick heart and brain. **J Biol Chem**, v. 265, n. 5, p. 2828-34, Feb 15 1990.

VERMA, S. K. et al. Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: an acetylcholine independent mechanism. **Toxicology**, v. 256, n. 3, p. 175-82, Feb 27 2009.

WHISHAW, I. Q. et al. Distinct forelimb and hindlimb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotarod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. **J Neurosci Methods**, v. 126, n. 1, p. 13-23, Jun 15 2003.

ZAFONTE, R. D. et al. Effect of citicoline on functional and cognitive status among patients with traumatic brain injury: Citicoline Brain Injury Treatment Trial (COBRIT). **JAMA**, v. 308, n. 19, p. 1993-2000, Nov 21 2012.

ZHANG, A. L. et al. The Rise of Concussions in the Adolescent Population. **Orthop J Sports Med**, v. 4, n. 8, p. 2325967116662458, Aug 2016.

ZHANG, L. N. et al. Na(+)-K(+)-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. **Fundam**