



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**PEDRO HENRIQUE CASSARO LIRIO**

**RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS TRAUMATISMO  
CRANIOENCEFÁLICO: UM MODELO EXPERIMENTAL**

Vitória  
2023

**PEDRO HENRIQUE CASSARO LIRIO**

**RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS  
TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO: UM  
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Area de concentração: Neurociências

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Zanela da Silva Arêas

Coorientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia Carla de Melo Rodrigues

Vitória  
2023

Pedro Henrique Cassaro Lirio

## **RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO: UM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fernando Zanela da Silva Arêas – Orientador  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Livia Carla de Melo Rodrigues – Coorientadora  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES  
(Examinador Interno)

---

Prof. Dra. Carmem Luíza Sartório  
Universidade Vila Velha – UVV  
(Examinador Externo)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os que lutam pela ciência e pela educação. À  
minha família e a todos os que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

Às Forças maiores do universo que me permitiram viver esse momento.

Aos meus pais, Claudia e Henrique, por toda força e amor incondicional, vocês são não só minha base, mas tudo aquilo que eu fui, sou e vou me tornar! Obrigado por me apoiarem e me darem suporte para continuar os meus estudos e realizar meus sonhos, mesmo quando esses sonhos parecem tão distante da realidade. Eu sou, porque somos.

A minha família, especialmente minhas avós, Arlete (in memoriam) e Teresa. Um pequeno relato sobre minha avó Arlete. Em uma das inúmeras conversas que tivemos tomando sol no portão da sua casa, ela me disse que o sonho dela era me ver formado. Por ocasião do destino, infelizmente ela não conseguiu estar presente, mas em todas as pequenas e grandes vitórias da minha vida, sinto seu amor e proteção. Vó, eu consegui! E vou continuar batalhando para ser a pessoa que você sempre enxergou em mim!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Zanela, pela oportunidade que me deu de realizar meu sonho e aprender tanto durante esse período. Obrigado pela paciência durante os intermináveis áudios de um jovem pesquisador discutindo teorias até a madrugada. Obrigado pelos conselhos e pela amizade! Fico feliz de termos implementado no laboratório uma nova linha de pesquisa e estarei de perto acompanhando e auxiliando, naquilo que for possível, a continuação desse capítulo!

A minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia Carla de Melo Rodrigues, ou deixando as formalidades de lado, “Liviaaaaaa!!!!!!”. É indescritível a gratidão que tenho por você! Não só pela orientação, mas pela linda amizade que temos! Que vai muito além dos muros da universidade. Como você gosta de dizer, “um encontro de almas”. Obrigado também por ter sido minha “mãe científica”, pelas inúmeras conversas e pelas oportunidades que você me deu, tenha total certeza de que você foi, é e sempre será muito importante em todo meu caminho.

As professoras, Dr<sup>a</sup> Rita Pires e Dr<sup>a</sup> Carmem Sartório, por comporem minha banca examinadora. É uma honra e enorme felicidade poder aprender com vocês. Obrigado por abrilhantarem o nosso trabalho.

Aos meus amigos,

Jessica, minha duplinha, é também indescritível o quanto você foi e é importante para mim. Obrigado pelas inúmeras horas de conversa, “devaneios científicos”, nossos cafés, sorvetes, McDonalds (Muito saudáveis, não?)... Pelas inúmeras horas que passamos conversando, rindo e chorando das coisas da vida e da nossa obsessão por Rihanna e RBD. Se eu fosse tentar escrever aqui uma parte de tudo que foi importante para mim ia precisar de umas 10 páginas, mas você sabe de tudo (ou quase tudo, porque certamente você esqueceu de algumas coisas).

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Meyrelles, ou melhor, Sil!!! Obrigado por sua maravilhosa amizade e pelos inúmeros cafés, almoços e conversas! Obrigado por tantos

conselhos e tanto carinho. Sempre te admitirei enquanto pesquisadora mesmo antes de te conhecer, e hoje, te admiro muito mais, não só pela cientista, mas pela pessoa incrível que você é. Nosso top 4 (Eu, você, Jessica e Livia) estará sempre junto! E mal posso esperar para nosso próximo café.

Matheus e Igor, obrigado por terem me dado suporte emocional e nos experimentos, durante todo esse período, certamente foi mais fácil com vocês do lado! Obrigado pelas intermináveis discussões e claro, nossa “neurogossip”, estaremos juntos, mesmo que cada um em um canto do mundo!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ester Miyuki, por toda a sua humildade e carinho, desde a primeira vez que nos conhecemos. Obrigado pelas horas de discussões nos grupos e por todos os seus conselhos. Enquanto aluno de graduação, lia seus artigos encantado com aquele universo que hoje, por sua causa e pelo seu legado, posso dizer que faço parte. Você será, sempre, uma grande inspiração para mim. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Elisardo Vasquez, por toda a sua grandiosa humildade e gentileza comigo. Foi uma honra para um jovem pesquisador como eu, aprender tanto com você. Se eu pude hoje apresentar a minha dissertação, foi porque você lutou por este programa de pós-graduação. Por isso e por tudo, minha enorme gratidão.

Aos alunos de IC: Walter, Thamiris e Juliana! Obrigado por sua imensa dedicação e ajuda. Muitas vezes até tarde da noite e aos finais de semana e feriados. Se hoje esse trabalho está construído, tenham certeza de que grande parte do motivo, foram vocês!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Polyana Dalpiaz, ou apenas, Poly! Não consigo colocar em palavras o quanto você foi e é importante para mim, obrigado pelas incontáveis conversas e trabalhos que fizemos juntos. Assim como sempre nos despedimos depois das conversas, digo a todos os momentos: “foi maravilhoso”! Você foi a primeira pessoa que me parabenizou quando fui aprovado no mestrado e desde aquele momento sabia que teríamos uma amizade linda! Obrigado!

Aos demais amigos do LCCNPF (Aebe, Bárbara, Elizângela, Jader) e LANEP (Rai, Celina, Alexandre e a mais recém-chegada, Beatriz), por todas as discussões e encontros! Fazer parte dessa família é uma das minhas maiores conquistas!

A (MSc) Jessyca Dutra, (Dr<sup>a</sup>) Laryssa Pinheiro e (Dr<sup>a</sup>) Marcela Segatto! Professoras que acreditaram em mim, quando eu era apenas um estudante curioso e meio perdido. Pelo empenho e pela confiança que vocês tiveram comigo, me tornei farmacêutico e pude seguir nos caminhos da ciência. Lembro da minha primeira apresentação de congresso, você estava lá, Jessyca! E eu sempre terei imensa gratidão por todo seu carinho.

Laryssa, obrigado por ter aberto as portas da ciência para mim. Agradeço também ao Prof. Marco Cunegundes pelas conversas e por todo o carinho durante minha iniciação científica. E também, a todos os colegas e colaboradores do LabNano, Rafa, Beto, Wanderson, Iuly, Natane, Prof. Dr. Jairo, Prof. Dr. Breno Valentim, Prof. Dr. Nardi e todos os que nessa época passaram pelo laboratório. Levo todos vocês comigo com extremo carinho e gratidão.

A minha “família” de Ribeirão Preto,

Fran, Isa, Karla, Pacu e Rafa. É impossível para mim colocar em palavras o quanto eu sou grato por ter vocês na minha vida. Todos vocês, com seu jeito único, fizeram de mim uma pessoa melhor. Aprendi e aprendo demais com todos vocês, cientificamente e no dia a dia da vida. Seremos sempre o inseparável “Team Geraldo Astolfo”, mesmo que também, estejamos cada um num lugar do mundo. Vocês me acolheram e fizeram me sentir em casa, por isso e por tudo, obrigado!

A Prof<sup>a</sup> Alline Cristina de Campos, por me permitir continuar a realizar meus sonhos e por ter aberto as portas do seu laboratório para mim. Obrigado por ter me permitido aprender com a grandeza que você é, não só para mim, mas para a ciência. E pela oportunidade de agora, ser orientado por você, nessa nova jornada da minha vida.

Aos professores do PPGCF, obrigado por todo o ensinamento dentro e fora da sala de aula. Pelas conversas nos corredores e por todo apoio e solicitude. Vocês me permitiram alçar novos sonhos e fizeram de mim, um pesquisador melhor.

Aos colegas do PPGCF e de outros programas, obrigado pela companhia e parceria durante esses 2 anos. Tenho gratidão e levarei sempre comigo as amizades que cultivei durante esse período. Agradeço também, a confiança que depositaram em mim enquanto fui representante discente (2021-2023). Obrigado a todos, Bruna, Chris, Felipinho, Thatiany, Vitor, Izabela, Rakel, Polyanna, Leozinho, Jana, Tatiani, Duda, Edgar, Paulo Vinicios (PPGEF), Larissa (PPGCO), Isadora (PPGCO) e a todos que os nomes não estão aqui, mas que participaram direta e indiretamente dessa jornada e aos quais sou igualmente grato.

A todos os alunos da UFES que tanto me ensinaram e que eu pude compartilhar um pouco de conhecimento. Vocês foram muito importantes, porque me mostraram o lugar no qual eu me sinto pertencente nesse vasto mundo. Obrigado.

Aos animais utilizados nessa pesquisa. Verdadeiros heróis anônimos que possibilitam o avanço da ciência e da saúde.

Por fim, quero agradecer a todos que lutaram e lutam pela educação e pela ciência. Faço uma pequena homenagem ao Prof. Dr. Raphael Mechoulam (in memoriam) e ao Prof. Dr. Elisaldo Carlini (in memoriam), por sua resistência e coragem. A todos os mestres, professores e eternos aprendizes, de ontem, de hoje e de amanhã.

Obrigado.

*“Nunca perca de vista seu ponto de partida”*

Santa Clara de Assis

## RESUMO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é um neurotrauma de fisiopatologia complexa causado por uma força mecânica externa. Os danos provenientes desse trauma podem ser divididos em primário e secundário. O primário se refere a danos relacionados à colisão mecânica do encéfalo e o secundário estão relacionados a processos neuroquímicos e imunoexcitotóxicos causados pela progressão temporal da injúria. Chamada de “epidemia silenciosa”, é a maior causa de incapacidade de jovens adultos ao redor do mundo. Modelos animais de TCE são utilizados para mimetizar os processos fisiopatológicos e com isso permitir a investigação de novas terapias e intervenções. O modelo *Weight-drop* permite a indução ao TCE em animais sem intervenções cirúrgicas prévias, possibilitando um melhor entendimento das cascatas fisiopatológicas do TCE. Além disso, nesse modelo, considerado o mais próximo ao TCE humano, o monitoramento de parâmetros vitais básicos pode ser utilizado como auxiliar na classificação e prognóstico relacionado ao TCE. No presente estudo, propomos um novo aparato de indução de modelo *Weight-drop* de cabeça fechada, representando uma indução de TCE moderadamente grave. Avaliamos o efeito de um projétil de 48,5g em queda livre de uma altura de 1,10m em ratos jovens-adultos de 8 semanas de idade. Foram utilizados os grupos controle (sham), G1 (1h pós-trauma), G2 (3 dias pós-trauma) e G3 (7 dias pós-trauma). Após a indução dos grupos TCE e o grupo Sham, foram submetidos a avaliações de peso diariamente, temperatura durante a primeira hora pós-TCE e diariamente durante os 7 dias. Foram também submetidos a testes comportamentais como campo aberto, para avaliar parâmetros motores e teste de reconhecimento de objetos, para avaliar alterações cognitivas. Além disso, amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo dos animais foram submetidas a testes de avaliação de estresse oxidativo, AOPP e TBARS. Nossos resultados demonstraram que animais submetidos a TCE possuem menor ganho de peso na avaliação de 7 dias, tal como apresentam flutuações importantes na temperatura. Os grupos submetidos a TCE apresentaram déficits motores e cognitivos, especialmente no 7º dia após a lesão. Além disso, apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo comparados ao grupo sham. Esses achados sugerem que o presente modelo pode ser um possível candidato para estudos translacionais.

Palavras-chave: Traumatismo Cranioencefálico; *Weight-drop*; Memória de Reconhecimento; Parâmetros Vitais; Estresse Oxidativo

## ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a neurotrauma with a complex pathophysiology caused by an external mechanical force. The damage from TBI can be divided into primary and secondary. The primary damage is related to mechanical collision of the brain and the secondary, related to neurochemical and immunoexcitotoxic processes caused by the temporal progression of the injury. Called the “silent epidemic”, it is the biggest cause of disability for young adults around the world. Animal models of TBI are used to mimic pathophysiological processes and allow the investigation of new therapies and interventions. The Weight-drop models allows the induction of TBI in rodents without previous surgical interventions, allowing a better understanding of the pathophysiological cascades of TBI. In addition, in this model, considered to be the closest to the human TBI, the monitoring of basic vital parameters can be used as an aid in the classification and prognosis related to TBI. In the present study, we propose a new weight-drop model apparatus to induce moderately severe closed-head TBI. We evaluated the effect of a 48.5g free-fall projectile from a height of 1.10 m in 8-week-old young adult rats. Control (sham), G1 (1h post-trauma), G2 (3 days post-trauma) and G3 (7 days post-trauma) groups were used. After the induction of TBI groups and the Sham group, had daily weight assessment, temperature within 1h post-TB and daily within the 7 days. Also, they underwent behavioral tests such as Open Field, to assess motor parameters and Novel Object Recognition test, to assess cognitive impairments. In addition, the prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus samples of the animals were used to assess levels of oxidative stress. Our results demonstrated that the TBI animals had less weight gain during the 7 days of evaluation, as well as significant fluctuations in body temperature. The TBI groups, also showed motor and cognitive deficits, especially on the 7th day after the injury. In addition, it showed higher levels of oxidative stress in the prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus compared to sham group. These findings suggest that the present model may be a possible candidate for translational studies.

Keywords: Traumatic Brain Injury; Weight-drop; Recognition Memory; Vital Parameters; Oxidative stress

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de definição dos danos primário e secundário causado por traumatismo cranioencefálico.....19
- Figura 2.** Exemplos dos diferentes tipos de traumatismo cranioencefálico.....20
- Figura 3.** Esquema do processo de excitotoxicidade mediada por glutamato. A ligação do glutamato aos receptores AMPA e receptores de cainato abre os canais dos receptores, resultando em influxo de Na<sup>+</sup> e consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (VDCC). Algumas formas de receptor AMPA também são permeáveis ao Ca<sup>2+</sup>. A ligação do glutamato ao NMDA sob condições despolarizantes abre o canal do receptor NMDA, resultando em grande influxo de Ca<sup>2+</sup>. A ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (MetabR) induz a produção de IP3 e a ativação de receptores de IP3 e canais de receptores de rianodina na membrana do retículo endoplasmático (RE), resultando na liberação de Ca<sup>2+</sup> do RE para o citoplasma. O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup> em resposta à ativação do receptor de glutamato pode induzir a captação de Ca<sup>2+</sup> para a mitocôndria que, se excessiva, pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibir a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Ao ativar proteases e induzir o estresse oxidativo, o Ca<sup>2+</sup> é um mediador chave da morte celularexcitotóxica.....21
- Figura 4.** Esquema representativo do receptor ionotrópico glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) e suas subunidades, além do sítio de ligação do seu agonista, Glutamato, e de seus co-agonistas.....23
- Figura 5.** Esquema dos eventos fisiopatológicos das lesões difusas no traumatismo cranioencefálico.....24
- Figura 6.** Representação da ativação aguda microglial aguda após Traumatismo Cranioencefálico. São ilustrados os fatores neurotóxicos liberados de uma micróglia ativada, demonstrando a interação de citocinas pró-inflamatórias e aminoácidos excitatórios, em especial, o glutamato. De particular importância é o efeito sobre a função mitocondrial, que quando deprimido aumenta a sensibilidade excitotóxica, bem como aumenta a geração de espécies de oxigênio.....25
- Figura 7.** Representação dos mecanismos de astrogliose após traumatismo cranioencefálico (TCE). O TCE promove a expressão de fatores como endotelina-1 (ET-1) e interleucina-1 (IL-1). ET-1 e IL-1 se ligam ao Receptor ETB e receptor IL-1 em astrócitos, respectivamente. Estímulos desses receptores ativam a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (CaM) que promovem a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), ciclina D1 e proteína quinase 2 associada a fase S (Skp2) via ativação de fatores de transcrição, incluindo o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), proteína de especificidade-1 (Sp-1) e fator nuclear-κB (NF-κB) em astrócitos, resultando em

astrogliose.....26

**Figura 8.** Principais modelos utilizados em roedores para indução de traumatismo cranioencefálico. a) O dispositivo de lesão por percussão de fluido usa injeção rápida de um pulso de fluido no espaço epidural. b) O modelo de impacto cortical controlado usa um pistão para penetrar no cérebro a uma distância e velocidade conhecidas. c) A lesão cerebral balística penetrante envolve a transmissão de projéteis com alta energia de uma haste metálica. d) No modelo de queda de peso (Weight-drop) de Feeney, um peso livre é lançado diretamente sobre a dura-máter exposta. e) No modelo de queda de peso (Weight-drop) de Marmarou, um disco de metal é colocado sobre o crânio para evitar fraturas ósseas. f) A lesão cerebral causada por explosão ocasiona por lesão primária de explosão, por exemplo, semelhante a explosões de granadas.....29

**Figura 9.** Equipamento para indução de Traumatismo Cranioencefálico pelo modelo Weight-drop.....35

**Figura 10.** Projétil final utilizado para indução de Traumatismo Cranioencefálico.....37

**Figura 11.** Representação esquemática da localização do bregma. A: Linha horizontal 0,2cm posterior aos cantos dos globos oculares direito e esquerdo. B: Linha horizontal entre as partes mais anteriores da hélice direita e esquerda. C: Linha vertical no ponto médio de A e B. Triângulo: Localização do Bregma e local do impacto. Círculo: localização Lambda. A distância do ponto A ao B é 0,8 cm.....38

**Figura 12.** Representação esquemática do desenho experimental. Em Verde: Grupo G0, Em Vermelho: Grupo G1, em Azul: Grupo G2, em Roxo: Grupo G3. Abreviações: CA: Campo Aberto; ETN: Eutanásia; TRO: Teste de Reconhecimento de Objetos.....41

**Figura 13.** (A) Demonstração da sessão de treino utilizando objetos semelhantes A1 e A1'; (B) Demonstração de sessão de teste de memória de curto prazo, na qual A1 é um objeto previamente conhecido e B1 um objeto novo (C) Demonstração da sessão de teste de memória de longo prazo, na qual A1 é um objeto previamente conhecido e C1 um objeto novo.....42

**Figura 14.** Caixa utilizada para testes comportamentais.....43

**Figura 15.** Objetos utilizados para o teste de reconhecimento de objetos. A1 e A1': Objetos semelhantes para a sessão de treinamento. B1: Novo objeto para a sessão de curto prazo. C1: Novo objeto para a sessão de longo prazo.....44

**Figura 16.** Gráfico de representação da massa corporal em relação ao tempo de 7 dias. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n=15) por grupo. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, teste de Tukey para comparações múltiplas. \*p<0,05.....48

**Figura 17.** Gráfico de representação da temperatura retal pré e após traumatismo

cranioencefálico em diferentes tempos. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n=15) por grupo. ANOVA de uma via para medidas repetidas, teste Tukey para comparações múltiplas. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .....49

**Figura 18.** Gráfico de representação da temperatura retal em relação ao período de 7 dias. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n=15) por grupo. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, teste Tukey para comparações múltiplas. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .....50

**Figura 19.** Gráfico de avaliação da distância total percorrida através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. (n= 8-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .....51

**Figura 20.** Gráfico de avaliação do tempo total de imobilidade através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-12) por grupo. ANOVA de uma para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$ .....52

**Figura 21.** Gráfico de avaliação do tempo de permanência na zona central do aparato através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas.....53

**Figura 22.** Gráfico de avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, realizada 1,5h após o treino. (n=10-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .....54

**Figura 23.** Gráfico de avaliação da memória de reconhecimento de longo prazo, realizada 24h após a sessão treino. (n= 10-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .....55

**Figura 24.** Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no córtex pré-frontal. n = 5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .....56

**Figura 25.** Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no hipocampo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ .....57

**Figura 26.** Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no hipotálamo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .....57

**Figura 27.** Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-

frontal. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \*p<0,05, \*\*p<0,01.....58

**Figura 28.** Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \*p<0,05, \*\*p<0,01.....59

**Figura 29.** Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no hipotálamo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \*p<0,05.....60

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Lista de projéteis utilizados na padronização do modelo para indução de Traumatismo Cranioencefálico. A tabela consta os materiais, diâmetro e comprimento em centímetros (cm), massa do projétil em gramas (g), energia em joules (J) e porcentagem de mortalidade pós traumatismo cranioencefálico.....36

**Tabela 2.** Dados das comparações múltiplas de massa corporal em gramas durante avaliação em 7 dias. Valores das colunas Controle (A) e TCE (B) expressos em média  $\pm$  EPM.....48-49

**Tabela 3.** Dados das comparações múltiplas de temperatura retal em °C durante avaliação em 7 dias. Valores das colunas Controle (A) e TCE (B) expressos em média  $\pm$  EPM.....51

**LISTA DE ABREVIÇÕES**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>2-AG</b>                | 2-Araquidonoilglicerol                                 |
| <b>AMPA</b>                | $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato |
| <b>AMPc</b>                | Monofosfato cíclico de adenosina                       |
| <b>AOPP</b>                | Ensaio dos produtos avançados da oxidação de proteínas |
| <b>ATP</b>                 | Adenosina trifosfato                                   |
| <b>BHE</b>                 | Barreira hematoencefálica                              |
| <b>BDNF</b>                | Fator neurotrófico derivado do cérebro                 |
| <b>CA</b>                  | Campo aberto   |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>     | Cálcio   |
| <b>Ca<sup>2+</sup>-CaM</b> | Cálcio-calmodulina proteína quinase                    |
| <b>ERK1/2</b>              | Proteína regulada por sinais extracelulares            |
| <b>ET-1</b>                | Endotelina 1   |
| <b>ETN</b>                 | Eutanásia  |
| <b>GFAP</b>                | Proteína ácida fibrilar glial                          |
| <b>GluN</b>                | Subunidade do receptor N-Metil-D-Aspartato             |
| <b>H<sup>+</sup></b>       | Hidrogênio   |
| <b>IBA-1</b>               | Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1    |
| <b>IL-1</b>                | Interleucina 1   |
| <b>IL-6</b>                | Interleucina 6   |
| <b>IP3</b>                 | Inositol trifosfato                                    |
| <b>K<sup>+</sup></b>       | Potássio   |
| <b>MAGL</b>                | Monoacilglicerol lipase                                |
| <b>MAPK</b>                | Proteína quinase ativada por mitógeno                  |
| <b>MetabGluR</b>           | Receptor glutamatérgico metabotrópico                  |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>           | Magnésio   |
| <b>Na<sup>+</sup></b>            | Sódio  |
| <b>NF-κβ</b>                     | Fator nuclear kappa beta                               |
| <b>NMDA</b>                      | N-Metil-D-Aspartato                                    |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Ânion superóxido                                       |
| <b>OH<sup>-</sup></b>            | Radical hidroxila                                      |
| <b>PCP</b>                       | Fenciclidina   |
| <b>PIC</b>                       | Pressão intracraniana                                  |
| <b>PPARs</b>                     | Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  |
| <b>RNS</b>                       | Espécies reativas de nitrogênio                        |
| <b>ROS</b>                       | Espécies reativas de oxigênio                          |
| <b>SKP2</b>                      | Proteína quinase 2 associada a fase S                  |
| <b>SP1</b>                       | Proteína de especificidade-1                           |
| <b>STAT3</b>                     | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3        |
| <b>TBARS</b>                     | Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| <b>TCE</b>                       | Traumatismo cranioencefálico                           |
| <b>TNF-α</b>                     | Fator de necrose tumoral α                             |
| <b>TRO</b>                       | Teste de reconhecimento de objetos                     |
| <b>VDCC</b>                      | Canais de cálcio dependentes de voltagem               |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b>           | Zinco  |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVO.....</b>   | <b>32</b> |
| 2.1 Objetivo Geral.....  | 32        |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 32        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1 Animais.....   | 33        |
| 3.2 Equipamento e Projétil.....  | 33        |
| 3.2.1 Aparato de Indução ao Traumatismo Cranioencefálico.....              | 33        |
| 3.2.2 Projétil.....  | 34        |
| 3.3 Método de Traumatismo Cranioencefálico.....                            | 36        |
| 3.3.1 Gravidade.....   | 38        |
| 3.4 Anestesia e Analgesia.....   | 38        |
| 3.4.1 Fármacos Anestésicos.....  | 38        |
| 3.4.2 Fármacos Analgésicos.....  | 38        |
| 3.5 Desenho experimental.....  | 39        |
| 3.6 Parâmetros Vitais.....   | 40        |
| 3.6.1 Temperatura corporal em dias.....                                    | 40        |
| 3.6.2 Temperatura corporal pós-trauma.....                                 | 40        |
| 3.6.3 Peso corporal.....   | 40        |
| 3.7 Testes Comportamentais.....  | 41        |
| 3.7.1 Teste de reconhecimento de objetos (TRO).....                        | 41        |
| 3.7.2 Campo Aberto.....  | 43        |
| 3.8 Coleta de tecido.....  | 44        |
| 3.9 Avaliação de estresse oxidativo.....                                   | 44        |
| 3.9.1 Ensaio dos produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP) .....  | 44        |
| 3.9.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ..... | 45        |
| 3.10 Análise estatística.....  | 45        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>72</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>73</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é um neurotrauma de fisiopatologia complexa causado por uma força mecânica externa (CAPPIZI; WOO; VERDUZCO-GUTIERREZ, 2020, DIXON, 2017). Os danos provenientes desse trauma podem ser divididos em primário e secundário. Os danos primários estão relacionados a colisão mecânica do encéfalo, enquanto os secundários estão associados a processos neuroquímicos e imunoexcitotóxicos causados pela progressão temporal da injúria (PAVLOVIC et al., 2019) (Figura 1).

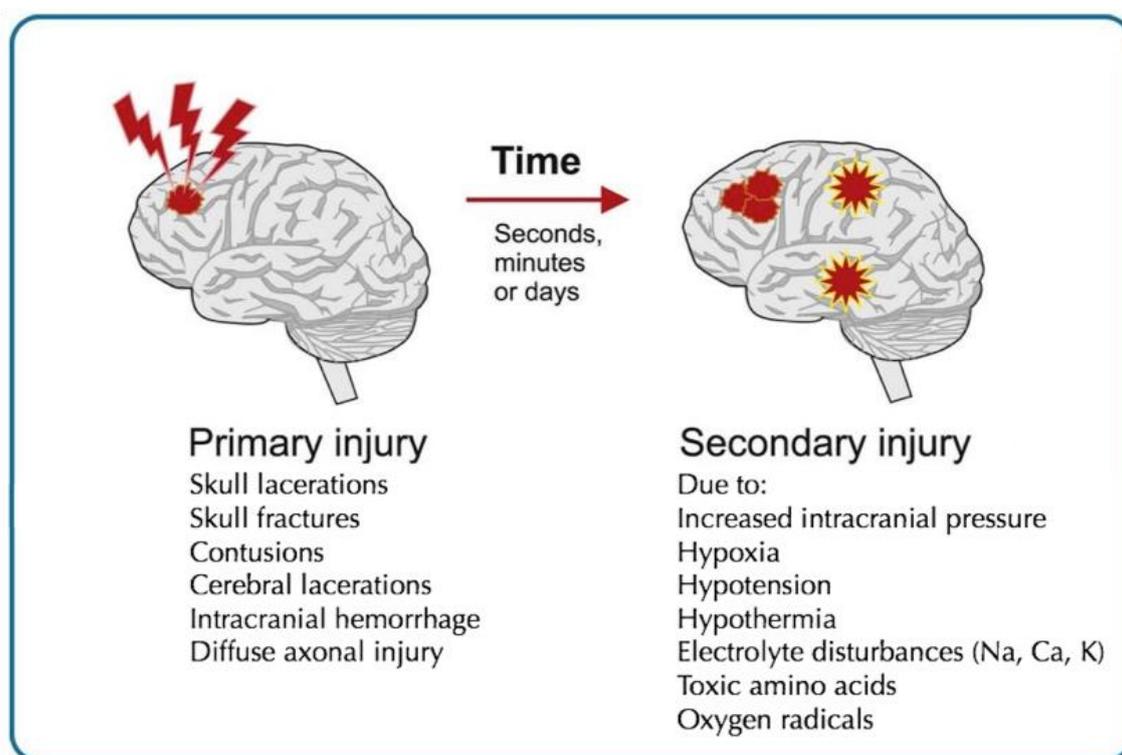


Figura 1. Esquema de definição dos danos primário e secundário causado por traumatismo cranioencefálico. Adaptado de *Bailey and Love's Short Practice of Surgery*, ed. 27, 2018.

As sequelas oriundas do TCE são diversas e variáveis, e dependem principalmente do tipo, local, abrangência e gravidade da lesão (Figura 2). As disfunções e sequelas ocasionadas por esse evento traumático podem abranger: (1) alterações motoras como na marcha (DEVER et al., 2022) e equilíbrio (REED et al., 2021, TEFERTILLER et al., 2019), (2) déficits cognitivos, tais como perda de memória episódica (ADAMOVICH-ZEITLIN et al., 2020, VAKIL et al., 2019), raciocínio lento e dificuldade de atenção (SHARP et al., 2011) e (3) transtornos

psiquiátricos na forma de transtornos de humor e alterações de personalidade, principalmente, relacionados à ansiedade (POLICH; IACCARINO; ZAFONTE, 2019) e depressão (FAKHOURY et al., 2021). Ademais, demonstrou-se recentemente, em estudos clínicos, a relação do TCE, principalmente os classificados como moderados a graves, com o acúmulo de marcadores patológicos (e.g. proteína TAU-hiperfosforilada e B-amilóide) relacionados a demências e outras doenças neurodegenerativas (BRETT et al., 2022, GRAHAM; SHARP, 2019, LOBUE et al., 2019), especialmente a Doença de Alzheimer (RAMOS-CEJUDO et al., 2018, XU et al., 2021).

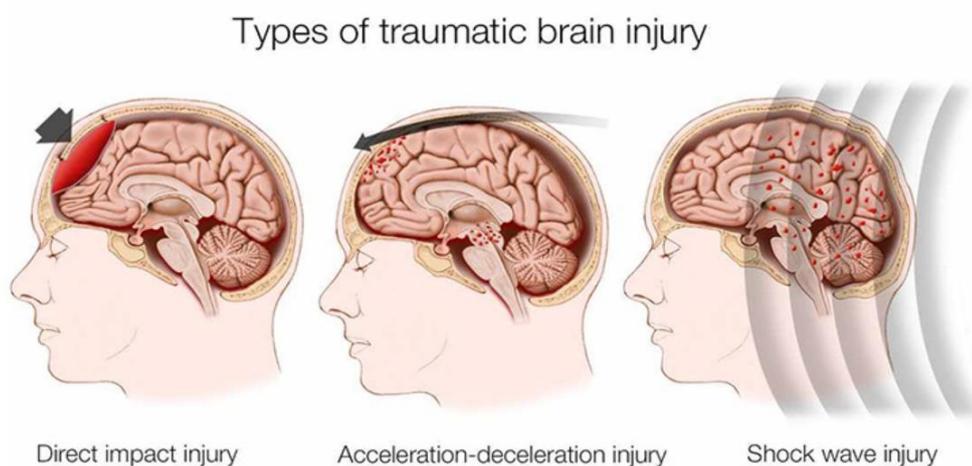


Figura 2. Exemplos dos diferentes tipos de traumatismo cranioencefálico. Disponível em: [santephysique.com](http://santephysique.com).

Chamada de “epidemia silenciosa”, é a maior causa de incapacidade de jovens adultos ao redor do mundo (ALKHAIBARY et al., 2021, DEWAN et al., 2018). Além disso, em todo o mundo é estimado que 70 milhões de pessoas por ano são acometidas por TCE, sendo que cerca de 11% desses eventos são classificados como graves. (DEWAN et al., 2018). No Brasil, no período de 2008 a 2019, a média anual de admissões hospitalares associadas a pacientes com TCE foi de cerca de 130.000 pessoas (ALMEIDA et al., 2015, CARTERI; SILVA, 2021, MAGALHÃES et al., 2022) e a mortalidade hospitalar em casos graves ultrapassou 30%, evidenciando uma importante questão de saúde pública (AREAS et al., 2019).

A fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico, apesar de possuir sua totalidade ainda desconhecida devido à complexidade dos eventos (MCGINN; POVLISHOCK, 2016), baseia-se no fenômeno da imunoexcitotoxicidade (BLAYLOCK; MAROON, 2011). A imunoexcitotoxicidade é a conjunção do fenômeno da excitotoxicidade (Figura 3) com a ativação e/ou secreção de fatores imunológicos e bioquímicos (MAROON et al., 2012). A excitotoxicidade (MATTSON, 2019, WANG; SWANSON, 2020) é um fenômeno no qual ocorre a hiperativação das vias neuronais glutamatérgicas através, principalmente, dos receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e posteriormente potencializada com a ativação dos demais receptores glutamatérgicos (e.g. alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e Cainato) devido a um ou mais estímulos, causando um grande influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 4).

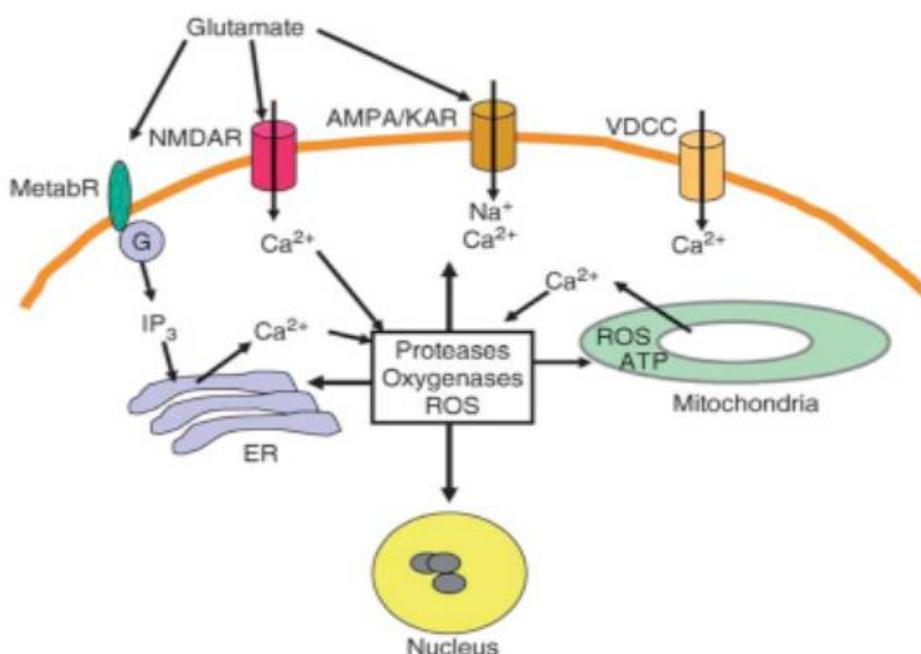


Figura 3. Esquema do processo de excitotoxicidade mediada por glutamato. A ligação do glutamato aos receptores AMPA e receptores de cainato abre os canais dos receptores, resultando em influxo de  $\text{Na}^+$  e consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VDCCs). Algumas formas de receptor AMPA também são permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A ligação do glutamato ao NMDA sob condições despolarizantes abre o canal do receptor NMDA, resultando em grande influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (MetabR) induz a produção de  $\text{IP}_3$  e a ativação de receptores de  $\text{IP}_3$  e canais de receptores de rianodina na membrana do retículo endoplasmático (RE), resultando na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE para o citoplasma. O aumento dos níveis citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta à

ativação do receptor de glutamato pode induzir a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  para a mitocôndria que, se excessiva, pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibir a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Ao ativar proteases e induzir o estresse oxidativo, o  $\text{Ca}^{2+}$  é um mediador chave da morte celular excitotóxica. Abreviações: AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato; KAR; receptor kainato; NMDAR, receptores de N-metil-D-aspartato; IP3: trifosfato de inositol. VDCC: Canais de Cálcio dependentes de voltagem; G: Glutamato; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio. Fonte: Adaptado de Mattson, 2019.

Subsequentemente, ocasiona uma excitação excessiva e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e dos níveis de óxido nítrico, mediando a alteração de diversas cascatas bioquímicas, tais como a da glicose e lactato, alterando sinapses, modificando a permeabilidade das membranas e ativando proteases, resultando em incapacidade ou morte neuronal (JAMJOOM et al., 2021, KHATRI et al., 2018, LADAK; ENAM; IBRAHIM, 2019, LOZANO et al., 2020, MATTSON, 2019, VERMA; LIZAMA; CHU, 2022). No traumatismo cranioencefálico, através desse mecanismo, os neurônios estão em constante despolarização e ativação (TEHSE; TAGHIBIGLOU, 2019). Ademais, vale ressaltar que o desbalanço nas sinapses glutamatérgicas, por serem as sinapses excitatórias mais importantes do sistema nervoso central, pode ocasionar um desequilíbrio sináptico, dificultando assim a formação e manutenção de *long-term potentiation* (LTP), ou em tradução livre, potenciação de longa duração, evento responsável pela consolidação de processos neuroplásticos, como a memória e aprendizado (FELDMANN et al., 2019, MIYAZAKI et al., 1992, REEVES; POVLISHOCK, 1995).

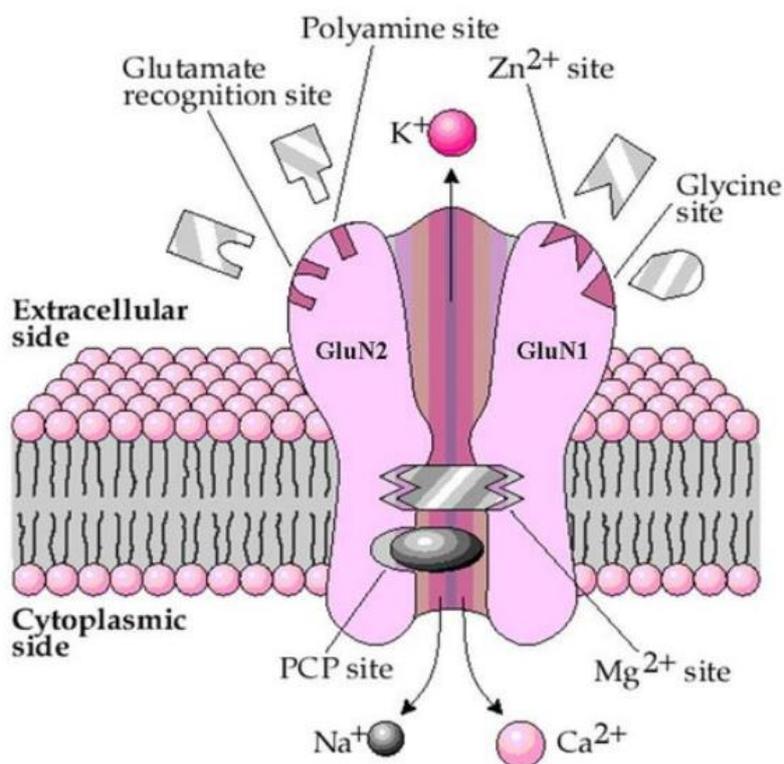


Figura 4. Esquema representativo do receptor ionotrópico glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) e suas subunidades, além do sítio de ligação do seu agonista, Glutamato e de seus co-agonistas. Abreviações:  $\text{Ca}^{2+}$ : Cálcio;  $\text{K}^+$ : Potássio;  $\text{Mg}^{2+}$ : Magnésio; PCP: Fenciclidida;  $\text{Zn}^{2+}$ : Zinco. Fonte: adaptado de Mor, 2012.

Para além disso, na fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico, é proposta uma hipótese de ativação dos receptores NMDA sem a presença do glutamato, na qual pode este receptor ser ativado tanto pelos seus co-agonistas (e.g. glicina, serina) e aspartato (TEHSE; TAGHIBIGLOU, 2019), quanto mecanicamente, pela chamada “*Shearing Force*” ou Força de Cisalhamento (ANDRADE et al., 2009). Esse termo pode se traduzir numa força mecânica que é aplicada sobre os neurônios durante o evento traumático, fazendo que seus dois componentes estruturais, substância cinzenta (corpos de neurônio) e a substância branca (axônios) se movam, causando alterações morfológicas (KIM et al., 2018). Salienta-se que por possuírem densidades diferentes, esses componentes podem se mover em direções opostas, sendo capaz de causar eventos como a lesão axonal difusa e a cromatólise do corpo celular, fato este que expõe a importância do estudo desse componente para a elucidação dos processos fisiopatológicos no

TCE (ANDRADE et al., 2009) (Figura 5).

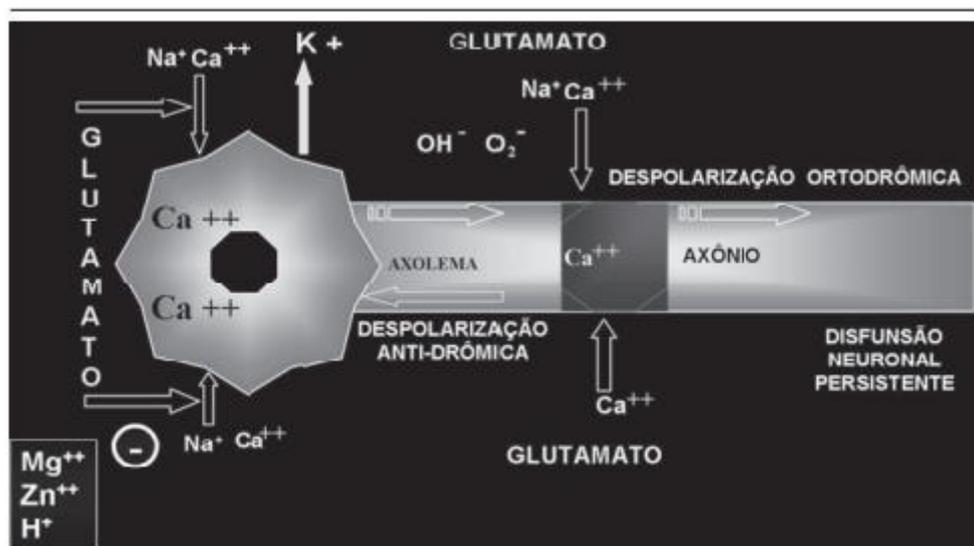


Figura 5. Esquema dos eventos fisiopatológicos das lesões difusas no traumatismo cranioencefálico. Abreviações:  $\text{Ca}^{++}$ : Cálcio;  $\text{H}^+$ : Hidrogênio;  $\text{K}^+$ : Potássio;  $\text{Mg}^{2+}$ : Magnésio;  $\text{OH}^-$ : Radical hidroxila;  $\text{O}_2^-$ : Ânion superóxido;  $\text{Zn}^{2+}$ : Zinco. Fonte: adaptado de Andrade et al., 2009.

Além dos neurônios, as células da glia exercem um importante papel no contexto fisiopatológico do TCE. Após um evento traumático, a micróglia, principal célula de defesa do sistema nervoso central, no período agudo e em seu estado de ativação completa, usualmente secreta fatores inflamatórios e ativa fatores imunológicos, como a IL-1B, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Figura 6) (BLAYLOK; MAROON, 2011). Os fenótipos de ativação microglial comumente são divididos em dois principais, M1 e M2 (TANG; LE et al., 2016). O estágio de ativação M1 exibe uma conformação de ramificações curtas e corpo celular entumescido, secretando citocinas pró-inflamatórias, tais como as supracitadas, e fatores pró-apoptóticos. Já no estágio M2, a micróglia apresenta uma morfologia de ramificações longas e de corpo celular menos volumoso, nesse estágio, exibe uma característica anti-inflamatória, secretando citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-13, dentre outras, as quais são responsáveis pela atenuação do processo inflamatório (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013, CORRIGAN et al., 2016, NORDEN et al., 2016). Não obstante, Jassam e colaboradores, em 2017, revelam a perspectiva que em relação ao traumatismo cranioencefálico, essa clássica divisão do fenótipo de ativação, não é capaz de traduzir completamente o papel microglial na patogênese dos eventos inflamatórios

oriundos do TCE, tanto devido à sua diversidade de ativação no local da injúria, quanto a complexidade do dano causado (JASSAM et al., 2017). Além disso, sabe-se que os danos secundários do TCE podem perdurar por longos períodos (meses e anos) após o evento, e o envolvimento e alteração de estágios de ativação da micróglia durante o período pós-traumático é crucial no desenvolvimento dos déficits neuropsiquiátricos e cognitivos tardiamente (MUCCIGROSSO, 2016, WITCHER et al., 2021). Esses fatos podem ser evidenciados com a maior presença de IBA-1, um dos principais marcadores microgliais, no córtex de animais submetidos a traumatismo cranioencefálico, meses após a lesão (MOUZON et al., 2014). Sendo assim, essa importante célula da neuroglia possui características para ser um potencial alvo terapêutico na manutenção do processo neuroinflamatório proveniente dos danos secundários relacionados ao TCE.

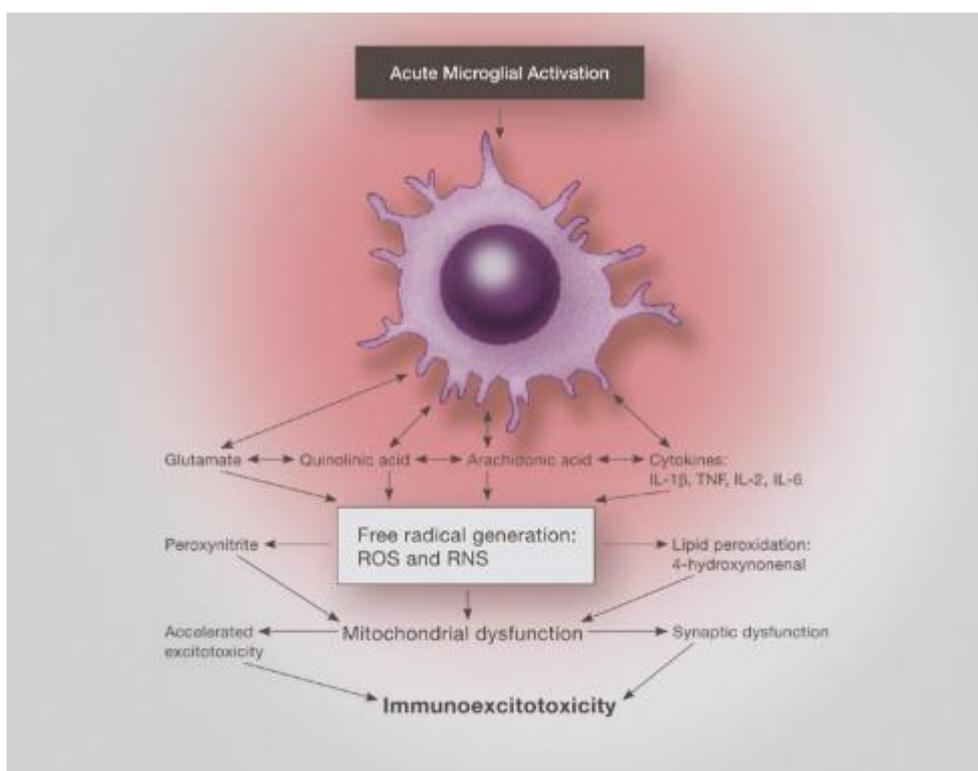


Figura 6. Representação da ativação aguda microglial aguda após Traumatismo Cranioencefálico. São ilustrados os fatores neurotóxicos liberados de uma micróglia ativada, demonstrando a interação de citocinas pró-inflamatórias e aminoácidos excitatórios, em especial, o glutamato. De particular importância é o efeito sobre a função mitocondrial, que quando deprimido aumenta a sensibilidade excitotóxica, bem como aumenta a geração de espécies de oxigênio. Abreviações: IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral; ROS: Espécies reativas de oxigênio; RNS: Espécies reativas de nitrogênio. Fonte: Adaptado de Blaylok e Maroon 2011.

Os astrócitos, na homeostase, têm função de nutrição e suporte aos neurônios, além de regular neurotransmissores e íons, especialmente glutamato e  $\text{Ca}^{2+}$ , no espaço sináptico. Além disso, têm o papel de manter a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (KARVE; TAYLOR; CRACK, 2016). Na ocorrência do TCE, ocorre o fenômeno denominado astrogliose, que pode ser definido como o aumento da atividade e/ou recrutamento astrocitário. Devido a esse fato, há aumento da secreção tanto de fatores de ativação astrocitária (e.g. GFAP) quanto de marcadores de inflamação e fatores de crescimento (BURDA; BERNSTEIN; SOFRONIEW, 2016, MICHINAGA; KOYAMA, 2021) (Figura 7).

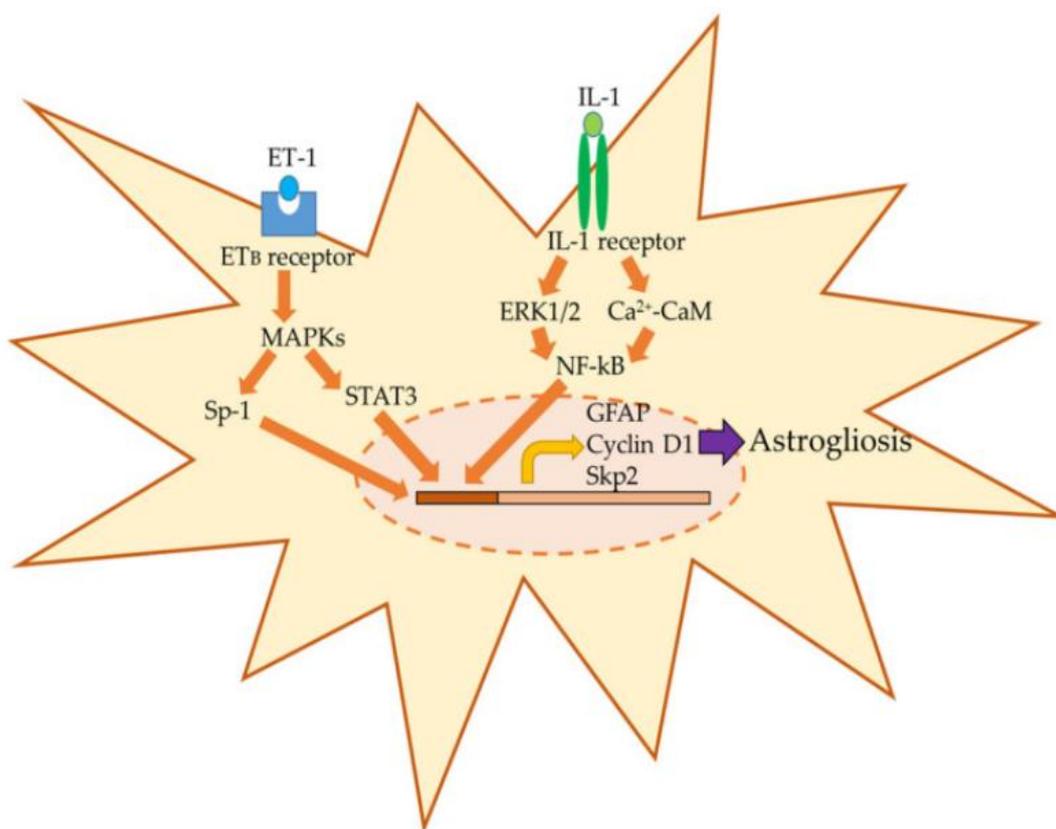


Figura 7: Representação dos mecanismos de astrogliose após traumatismo cranioencefálico (TCE). O TCE promove a expressão de fatores como endotelina-1 (ET-1) e interleucina-1 (IL-1). ET-1 e IL-1 se ligam ao Receptor ET<sub>B</sub> e receptor IL-1 em astrócitos, respectivamente. Estímulos desses receptores ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaM) que promovem a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), ciclina D1 e proteína quinase 2 associada a fase S (Skp2) via ativação de fatores de transcrição, incluindo o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), proteína de especificidade-1 (Sp-1) e fator nuclear-κB (NF-κB) em astrócitos, resultando em astrogliose. Abreviações: Citadas anteriormente no texto. Fonte: Adaptado de Michinaga e Koyama, 2021.

Conjuntamente, há uma incapacidade na ação de remoção do excesso de glutamato devido a uma *down-regulation* de transportadores essenciais (e.g. transportadores de aminoácitos excitatórios 1 e 2 (EAAT1 e EAAT2)) para a recaptação glutamatérgica, o que contribui para a ocorrência de uma cascata de eventos excitotóxicos gradativa (BESCHORNER et al., 2007, LI; WANG; QIN, 2021, ZHOU et al., 2020). Não obstante, os astrócitos possuem um papel fundamental para a recuperação após TCE (YUAN; WU, 2022). Como resposta à astrogliose, são secretados fatores de transcrição responsáveis pela expressão de receptores nucleares, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). Através da sinalização desses receptores, há um aumento da atividade de rotas de sinalização como NF-κB e NrF2, promovendo ações anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (CHENG et al., 2019). Além disso, evidências demonstram a participação do sistema endocanabinóide, especialmente pelo aumento do endocanabinóide 2-araquidonoilglicerol (2-AG), como compensação neuroprotetora pós-TCE. Essa evidência foi corroborada por Hu e colaboradores (2022), ao utilizar um modelo de camundongos *knockout* para monoacilglicerol lipase (MAGL), enzima responsável pela degradação de 2-AG, demonstrando proteção contra os déficits cognitivos após serem submetidos a TCE leve (HU et al., 2022). Vale ressaltar que este estado de ativação astrocitária mantém-se por longos períodos após a injúria (LEI et al., 2015, ZOLTEWICZ et al., 2013), o que reflete a tentativa de reestabelecimento da homeostase na janela de danos secundários. Portanto, assim como a micróglia, os astrócitos possuem um importante papel na patogênese e na recuperação das sequelas do TCE e, diante disso, tornam-se importantes alvos terapêutico no seu manejo.

Além dos eventos supracitados, num evento neurotraumático, comumente há ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), possibilitando a infiltração de células do complexo imunológico periférico e agravando o processo inflamatório (THEUS; CASH, 2020). Estudos recentes também evidenciam que o tratamento agudo para restaurar a função da BHE após a ruptura pode otimizar o prognóstico de pacientes e em modelos animais (VAN VLIET et al., 2020)

Atualmente, existem diversos modelos para indução de traumatismo cranioencefálico em roedores e outras espécies de maior porte (e.g. coelhos,

porcos e primatas não-humanos) (CERNAK, 2005). Feeney, em 1981, foi o pioneiro deste movimento, utilizando o modelo *Weight-drop*, produzindo uma injúria predominantemente focal com a dura-máter exposta e demonstrando a possibilidade de mimetizar parcialmente o TCE humano em roedores (FEENEY et al., 1981). O modelo *Weight-drop*, utilizado também no presente trabalho, consiste na queda livre de um peso pré-determinado no crânio do animal (cabeça fechada) ou diretamente na dura-máter exposta do animal (CHIU et al., 2016). Por ser um modelo que é capaz de se aproximar ao TCE humano, devido às suas características, é considerado clinicamente relevante e adequado para pesquisas translacionais. Além disso, o modelo *Weight-drop* pode ser adaptado de diversas formas, como por exemplo, a colocação de um disco de metal sobre o crânio do animal, de modo a ocasionar a dissipação da energia, para a realização de uma lesão difusa, muito embora comumente o modelo seja utilizado para lesões focais (KALISH; WALEN, 2016). Esse modelo de TCE é conhecido também por ocasionar déficits cognitivos, de curto e longo prazo. Acúmulos de proteína B-amilóide, como mencionado anteriormente, são também descritos no modelo (SHISHIDO et al., 2019). Em suma, o dano através do método *Weight-drop* produz grande perda neuronal, importante neuroinflamação, elevação dos níveis de citocinas e marcadores apoptóticos e alterações comportamentais, motivos esses que caracterizam sua importância na pesquisa dos processos fisiopatológicos do TCE, tal como a busca por novos tratamentos (MA et al., 2019).

Dentre os modelos mais utilizados na atualidade, estão: *Weight-drop*/Queda de peso (KHALISH; WHALEN, 2016), *Controlled Cortical Impact*/Impacto cortical controlado (FOURNIER et al., 2021), *Fluid percussion*/Percussão por fluido (WITCHER et al., 2021), *Blast wave*/Onda de choque (NAKAGAWA et al., 2011) e o mais recente, *Closed-Head Impact Model of Engineered Rotational Acceleration (CHIMERA)*/Impacto com aceleração rotacional (MCNAMARA et al., 2020). Entre as características dos modelos, podem ser modificadas: a natureza do dano causado (direto ou indireto), a gravidade da lesão, injúria focal ou difusa, a imobilização ou não da cabeça do animal utilizado, possuir características estáticas ou dinâmicas e o emprego de craniotomia (NAJEM et al., 2021). Cada modelo possui características distintas e objetivos claros ao serem utilizados, visto que devido à sua heterogeneidade, nenhum dos modelos

atualmente descritos são capazes de contemplar, na sua totalidade, a complexidade do TCE humano (PETERSEN et al., 2021) (Figura 8).

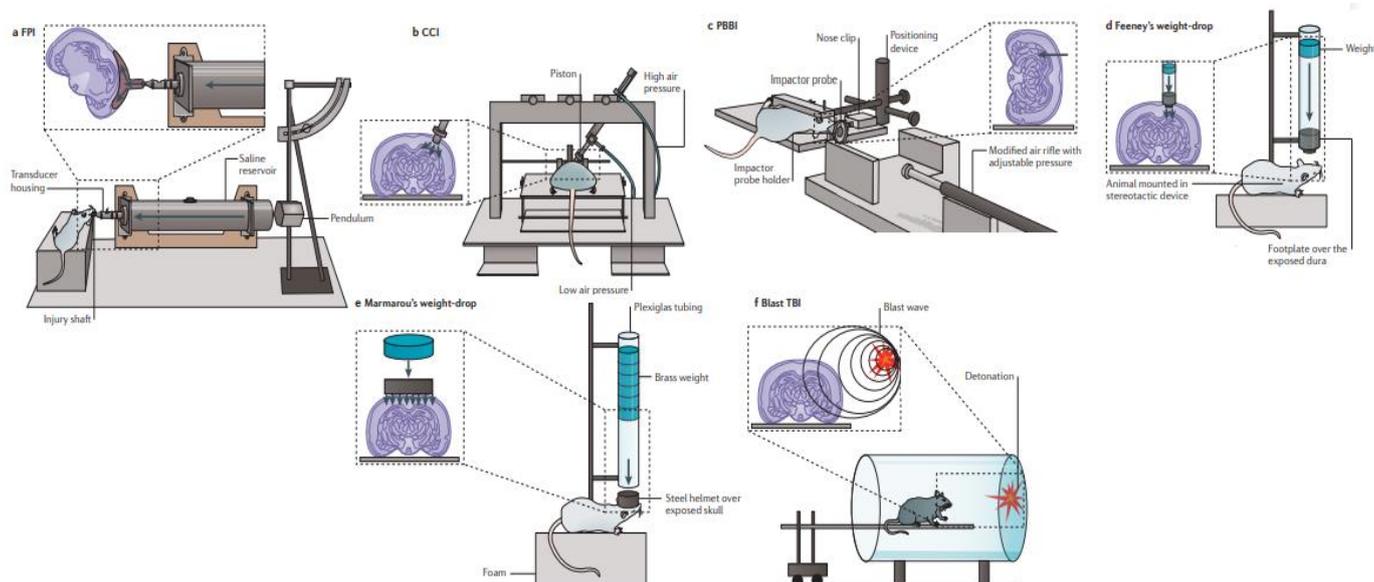


Figura 8: Principais modelos utilizados em roedores para indução de traumatismo cranioencefálico. **a)** O dispositivo de lesão por percussão de fluido usa injeção rápida de um pulso de fluido no espaço epidural. **b)** O modelo de impacto cortical controlado, usa um pistão para penetrar no cérebro a uma distância e velocidade conhecidas. **c)** A lesão cerebral balística penetrante envolve a transmissão de projéteis com alta energia de uma haste metálica. **d)** No modelo de queda de peso (*Weight-drop*) de Feeney, um peso livre é lançado diretamente sobre a dura-máter exposta. **e)** No modelo de queda de peso (*Weight-drop*) de Marmarou, um disco de metal é colocado sobre o crânio para evitar fraturas ósseas. **f)** A lesão cerebral causada por explosão ocasiona por lesão primária de explosão, por exemplo, semelhante a explosões de granadas. Abreviações: FPI: Lesão por percussão de fluido; CCI: Impacto cortical controlado; PBBI: Lesão cerebral balística penetrante; *Blast TBI*: Lesão cerebral causada por explosão. Fonte: adaptado de Xiong, Mahmood, Chopp, 2013.

A incessante busca de um modelo para mimetizar diversos fatores do TCE humano pode ser explicada pela falta de terapias eficazes para abranger a totalidade das sequelas provenientes dos danos primários e secundários. Atualmente o esquema terapêutico do TCE é feito de acordo com a gravidade e, apesar de existirem diretrizes de tratamento, ainda são inconclusivas devido a uma carência de evidências (CARNEY et al., 2017). Além de técnicas cirúrgicas, como a craniectomia descompressiva, drenagem do líquido cefalorraquidiano, utilizadas para manter os níveis de pressão intracraniana (PIC), são empregadas outras formas de manejo críticas, tais como: a hipotermia terapêutica, hipocapnia e a

supressão metabólica, cuja utilização e o momento da intervenção ainda são controversos. (STOCCHETTI et al., 2017).

A farmacoterapia aplicada em pacientes acometidos por TCE, principalmente nos casos graves, são baseadas em anestésicos e sedativos (e.g. propofol e barbitúricos, respectivamente) e agentes analgésicos (e.g. opioides) (CARNEY et al., 2017). Alguns estudos buscam a eficácia de fármacos “*off-label*”, como os bloqueadores dos canais de cálcio (e.g. Nimodipino) devido à plausibilidade de tratamento, considerando a cascata fisiopatológica dos danos secundários, porém, os estudos ainda são considerados inconclusivos (CARLSON et al., 2020). Em estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais, novos tratamentos farmacológicos promissores são propostos com o objetivo de atuar em sequelas específicas pós-TCE. Titus e colaboradores (2015) propõem que a utilização de inibidores da fosfodiesterase são capazes de aumentar a síntese e ação de AMP cíclico, principalmente no hipocampo, justificando seu uso no tratamento de déficits cognitivos. Fármacos com características antioxidantes, tais como a n-acetil cisteína (EAKIN et al., 2014) e metabólitos secundários de plantas, em especial flavonoides (DAVIS; VEMUGANTI, 2022), também são investigados em modelos animais, demonstrando ação promissora contra o dano causado pelo estresse oxidativo. Além disso, os fitocanabinóides, principalmente o Canabidiol, por exercer ação em diversos receptores, apresenta respostas anti-inflamatórias, antioxidantes e também no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, especialmente ansiedade e depressão (CAMPOS et al., 2017). Além de já ser utilizado no tratamento de epilepsias (e.g. Síndrome de Dravet) e em neuropatias, mostra-se como um forte candidato para o tratamento de diversas das sequelas ocasionadas pelo TCE (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020, HERGERT et al., 2021). Vale ressaltar que, devido à sua heterogeneidade, nenhuma monoterapia, até os dias atuais, é capaz de abranger o grande espectro de sequelas pós-TCE. Apesar de vários estudos apontarem uma direção para o tratamento farmacológico, poucos fármacos atravessam a “barreira” translacional para a utilização clínica.

Atualmente, diversos métodos de monitoramento de índices e marcadores fisiológicos são utilizados no manejo do TCE. Microdiálise (marcador da rota anaeróbia da glicose), o monitoramento da PIC, temperatura corporal e alteração

dos níveis plasmáticos de marcadores, tornam-se imprescindíveis para a compreensão do estado geral dos pacientes (KHELLAF; KHAN; HELMY, 2019). Na atual “era dos biomarcadores”, várias moléculas são utilizadas como sinalizadoras de doenças e/ou eventos anormais com a finalidade de compreender processos fisiopatológicos e possibilitar a investigação de novos alvos terapêuticos. No TCE, vários biomarcadores já foram descritos, tanto em modelos animais quanto em humanos, como importantes marcadores relacionados à gravidade, aos danos e prognóstico (HUIE et al., 2021). Rzechorzek e colaboradores (2022), trazem a perspectiva da monitorização diária de temperatura ser um parâmetro indispensável para a predição de sobrevivência em humanos. Além disso, diversos trabalhos em roedores, trazem a perspectiva da temperatura como importante fator modulável para o desfecho de animais submetidos a TCE (GRIESBACH, et al., 2013).

Em suma, vários modelos pré-clínicos para mimetizar TCE foram construídos durante várias décadas. Entretanto, ainda não foram realizados trabalhos que envolvam um aparato do modelo *Weight-drop* de impacto focal único, utilizando projéteis e sem intervenções cirúrgicas em ratos. Portanto, o presente trabalho pretende desenvolver um novo aparato do modelo *Weight-drop* como possível modelo translacional, assim como alterações de parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo e parâmetros vitais básicos e comportamentais de ratos adultos jovens submetidos a traumatismo cranioencefálico.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

- Desenvolver e validar um novo modelo *weight-drop* para indução a traumatismo cranioencefálico para ratos jovens-adultos.

### Específicos

- Avaliar diferentes projéteis na indução a traumatismo cranioencefálico pelo modelo *weight-drop* em ratos jovens-adultos.
- Analisar o efeito do traumatismo cranioencefálico na memória de reconhecimento de curto e longo prazo de ratos jovens-adultos.
- Avaliar a atividade motora e exploratória de ratos submetidos a traumatismo cranioencefálico.
- Avaliar alterações no peso e na temperatura de ratos traumatizados pelo modelo *weight-drop*.
- Avaliar os níveis de oxidação proteica no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos a traumatismo cranioencefálico.
- Avaliar os níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos a traumatismo cranioencefálico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 159 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos-jovens, com 8 semanas de vida e peso inicial entre 250-280g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e com umidade controlada, num ciclo claro-escuro 12/12h controlado artificialmente, com água e alimento *ad libitum*. Os animais foram alojados em grupos de 4 a 5 por gaiola. Os procedimentos e protocolos descritos nesse projeto passaram por avaliação e aprovação da Comissão de Ética em Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, tendo como número de processo 12/2021. Foram respeitados todos os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais.

#### 3.2 Equipamento e projétil (*Weight-drop*)

##### 3.2.1 Aparato de indução do Traumatismo Cranioencefálico

O equipamento para indução ao traumatismo cranioencefálico para ratos foi desenvolvido a partir de modificações realizadas a modelos do método "*Weight-drop*", tais como demonstrados por Feeney e Shapira (FEENEY et al., 1981, SHAPIRA et al., 1988), para se adequar ao objetivo do estudo. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a desenvolver e apresentar um aparato de indução de traumatismo cranioencefálico do modelo *Weight-drop* utilizando um projétil com contato único e sem interferência cirúrgica (e.g. craniotomia) para ratos contendo os sistemas a seguir: o presente modelo apresenta como características próprias a presença de um Sistema de eletroímã com capacidade de sustentação de um projétil com até 50g de massa e até 12,6cm comprimento. Além disso, objetivando uma fixação plena da cabeça do animal e buscando a padronização do local da indução ao trauma, foi adaptado ao modelo uma fixação auricular, proveniente do "braço" de um estereotáxico (Figura 9). O equipamento consta com

as seguintes medidas: MDF inferior (base) com 2cm largura e 15cm comprimento; MDF horizontal com 4cm largura e 15cm altura; MDF superior com 2cm largura e 15cm comprimento; Tubo de aço inoxidável 95cm de altura + queda livre de 15cm (totalizando 110cm do topo do aparato até o contato com a cabeça do animal); Braço de estereotáxico medindo 20cm comprimento e 2,5cm altura com fixadores de 12,5cm de comprimento. Ademais, o aparato consta com um sistema de balanceamento (com bases de altura moduláveis) para garantir estabilidade do mesmo em relação ao plano onde foi posicionado.



Figura 9: Equipamento para indução de Traumatismo Cranioencefálico pelo modelo *Weight-drop*.  
Fonte: do autor

### 3.2.2 Projétil

A base do projétil possui 2,2cm de comprimento e 0,6cm de diâmetro, sendo que 2cm desse comprimento é feito em aço inoxidável e 0,2cm em borracha (látex) com uma ponta abaulada de 1mm também em aço inoxidável (Figura 10). Vale ressaltar que a estrutura em borracha é de extrema importância no modelo apresentado, para evitar afundamento total do crânio.

Todos os projéteis utilizados nesse projeto (Tabela 1), contaram com a mesma base, sendo essa a estrutura do projétil que vai de encontro à cabeça do animal. A diferença entre os projéteis utilizados no projeto, além dos materiais em que foram produzidos, diâmetro e comprimento, foi o acréscimo de peso através de uma parte removível. Ademais, todos os acréscimos de peso, possuem uma ponta rosqueável, permitindo a correta fixação com a base.

| PROJÉTIL | MATERIAL | DIÂMETRO | COMPRIMENTO | MASSA (g) | ENERGIA (J) | MORTALIDADE |
|----------|----------|----------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| #1       | Aço      | 0,4cm    | 3,6cm       | 6,67g     | 0,072J      | 0%          |
| #2       | Aço      | 0,4cm    | 4,4cm       | 7,75g     | 0,083J      | 0%          |
| #3       | Ferro    | 0,42cm   | 7,5cm       | 19,80g    | 0,213J      | 0%          |
| #4       | Ferro    | 0,5cm    | 9,2cm       | 27,07g    | 0,292J      | 0%          |
| #5       | Ferro    | 0,5cm    | 12cm        | 35,34g    | 0,381J      | 0%          |
| #6       | Latão    | 0,6cm    | 12,6cm      | 48,50g    | 0,522J      | 14,2%       |

Tabela 1: Lista de projéteis utilizados na padronização do modelo para indução de Traumatismo Cranioencefálico. A tabela consta os materiais, diâmetro e comprimento em centímetros (cm), massa do projétil em gramas (g), energia em joules (J) e porcentagem de mortalidade pós traumatismo cranioencefálico. n = 10 para #1, #2, #3, #4 e #5 e n = 109 (n final = 92) para #6. Fonte: do autor

Após realização dos testes, o único projétil capaz de reproduzir um traumatismo cranioencefálico que apresentou sangramento subdural, formação de processo inflamatório, comportamento de dor no animal e grau de mortalidade foi o projétil #6, que corresponde em média a  $20\% \pm 3$  do peso corporal total dos animais, sendo este o projétil utilizado na padronização e validação do modelo.



Figura 10: Projétil final utilizado para indução de Traumatismo Cranioencefálico. Fonte: do autor

### 3.3 Método de Traumatismo Cranioencefálico (*Weight-drop*)

O modelo *Weight-drop* consiste na queda livre de um projétil de encontro à cabeça do animal, causando uma injúria focal ou difusa na área de impacto. (KALISH; WHALEN, 2016). A liberação e consequente queda do projétil é acionada através de um pedal, cessando a atividade eletromagnética que suporta o projétil no topo do equipamento. Após a administração do plano anestésico, os animais foram posicionados com a cabeça no centro do sistema de mira. Para garantir a fixação plena e o padrão do local do trauma, o animal foi fixado pela região auricular, com o auxílio de um estereotáxico.

Em nosso modelo, o projétil é liberado de uma altura de 1,10m de encontro à região frontal da cabeça do animal, causando um TCE focal. Similar ao estudo de Silva e colaboradores (2011), neste modelo, não é realizada exposição de dura-

máter e/ou do crânio do animal, caracterizando-se como um traumatismo de “cabeça fechada”. Utilizou-se como parâmetro 2mm anterior ao bregma. Em nosso modelo, o bregma foi encontrado através da marcação orelha-orelha do animal e traçada uma linha média para encontro da área medial da fissura. Ademais, fez-se uma marcação 0,2cm posterior ao globo ocular para encontro do local exato do alvo. Além disso, para confirmação, foi feita a medida de distância do lambda ao bregma, na qual 0.8cm é o parâmetro utilizado (Figura 11). Como mencionado anteriormente, os animais foram submetidos a TCE na região frontal do crânio e, conseqüentemente, atingindo as áreas frontais do córtex e conseqüentemente, subcorticais do animal.

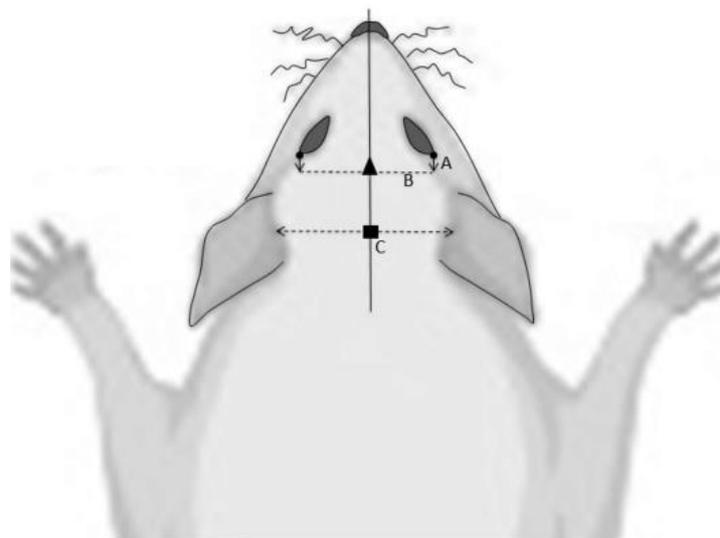


Figura 11: Representação esquemática da localização do bregma. A: Linha horizontal 0,2cm posterior aos cantos dos globos oculares direito e esquerdo. B: Linha horizontal entre as partes mais anteriores da hélice direita e esquerda. C: Linha vertical no ponto médio de A e B. Triângulo: Localização do Bregma e local do impacto. Círculo: localização Lambda. A distância do ponto A ao B é 0,8 cm. Fonte: do autor.

Após o impacto, os animais foram rapidamente removidos da contenção e devolvidos para caixas individuais. Além disso, os animais foram acompanhados até que o efeito anestésico tivesse sido completamente cessado e que fossem capazes de ingerir água e/ou ração. Após a recuperação da anestesia, os animais foram devolvidos para suas gaiolas-casa. Para verificação de dor, foram avaliadas alterações de parâmetros usuais de postura e cerramento de pálpebras.

### **3.3.1 Gravidade**

A classificação de gravidade do Traumatismo cranioencefálico pelo modelo *Weight-drop* ainda não é estabelecida completamente na literatura, apenas são relatadas escalas neurocomportamentais e cognitivas para avaliação dos prejuízos provenientes do TCE (MA et al., 2019). Em nosso estudo, apenas o projétil #6 foi considerado para avaliar a gravidade. Portanto, consideramos a gravidade do presente modelo em relação à mortalidade de animais que foram submetidos a traumatismo cranioencefálico. 14,2% dos animais (n=17), dos 109 utilizados, foram a óbito ao serem submetidos ao experimento e, com o presente dado, classificamos o modelo de traumatismo realizado como moderadamente grave.

## **3.4 Anestesia e Analgesia**

### **3.4.1 Fármacos Anestésicos**

Foi administrada anteriormente ao traumatismo cranioencefálico e ao grupo controle (sham), Cloridrato de Cetamina 10% (Syntec, SP, Brasil) 75mg/kg em associação com Cloridrato de Xilazina 10% (Syntec, SP, Brasil) 5mg/kg por via intraperitoneal (IP). Testes para avaliação de reflexo interdigital e palpebral foram realizados para confirmar a ação do plano anestésico.

### **3.4.2 Fármacos Analgésicos**

Após serem submetidos ao traumatismo cranioencefálico e cessados os efeitos anestésicos, foram administrados por via oral (VO) 1 gota de Dipirona Monoidratada (EMS, SP, Brasil) equivalente a 25mg e 1 gota de Cloridrato de Tramadol (Eurofarma, SP, Brasil) equivalente a 2,5mg. Além disso, foram adicionados na água de beber uma dosagem de 250mg/kg Dipirona + 50mg/kg de Tramadol. Todos os cálculos da dose dos fármacos foram realizados com base na quantidade diária, em mililitros, de consumo de água dos animais. O grupo controle (sham), também recebeu, na mesma quantidade, todos os fármacos analgésicos.

### 3.5 Desenho experimental

- (G0) Controle (Sham)
- (G1) Trauma 1 hora
- (G2) Trauma 3 dias
- (G3) Trauma 7 dias

Para a padronização do método, os animais foram divididos em 4 grupos: (0) Controle (Sham), (G1) Trauma 1 hora, (G2) Trauma 3 dias e (G3) Trauma 7 dias (Figura 12). Os períodos de tempo dos grupos correspondem a quantidade de dias após a indução do TCE e, conseqüentemente, o dia da eutanásia. Todos os grupos foram submetidos a anestesia intraperitoneal (IP) e posteriormente apenas os grupos G1, G2 e G3 ao traumatismo cranioencefálico. Os animais foram acompanhados após cessação do efeito anestésico por 1h ou até que pudessem ingerir água e/ou ração. Salienta-se que o grupo controle (sham) foi submetido a todas as etapas do método descrito, exceto a indução do traumatismo cranioencefálico. Para as análises de peso e temperatura foram considerados apenas 2 grupos (Controle e G3) devido ao período de 7 dias aos quais esses grupos foram avaliados. Apenas os animais dos grupos G0, G2 e G3 foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para análises comportamentais de memória de curto e longo prazo e de campo aberto para avaliação da atividade locomotora. Vale ressaltar que os animais utilizados em cada teste foram de grupos distintos, a fim de evitar vieses no comportamento apresentado ( $n = 62$  para testes comportamentais). O grupo G1 foi analisado para as temperaturas pós-trauma e avaliação de testes bioquímicos ( $n_{G1} = 18$ ). Por fim, 12 animais foram divididos nos grupos G0, G2 e G3 para realização de *pool* amostral do hipotálamo. Todos os grupos tiveram as amostras do encéfalo removidas, sendo o córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo dissecados separadamente e submetidos aos testes propostos.

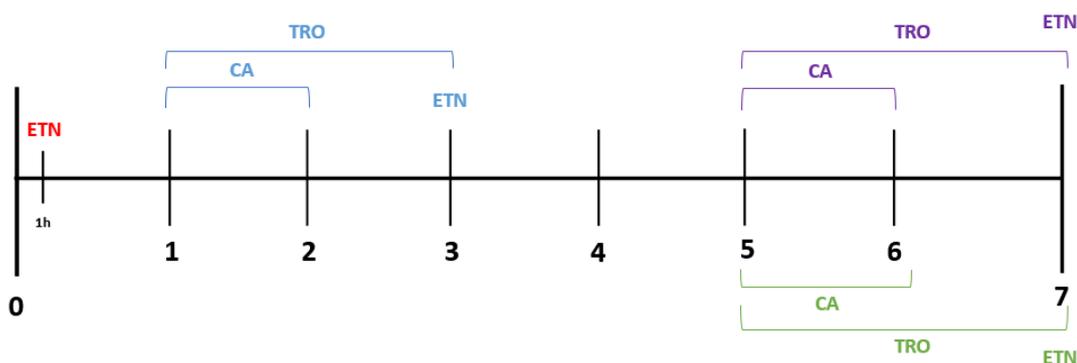


Figura 12: Representação esquemática do desenho experimental. Em Verde: Grupo G0, Em Vermelho: Grupo G1, em Azul: Grupo G2, em Roxo: Grupo G3. Abreviações: CA: Campo Aberto; ETN: Eutanásia; TRO: Teste de Reconhecimento de Objetos. Fonte: do autor.

### 3.6 Parâmetros Vitais

#### 3.6.1 Peso corporal

Diariamente, também durante um período de 7 dias, foi realizada a pesagem dos animais do grupo controle e do grupo submetido a TCE com o auxílio de uma balança digital.

#### 3.6.2 Temperatura corporal em dias

Diariamente, durante um período de 7 dias, foi aferida a temperatura corporal dos animais induzidos a traumatismo cranioencefálico (G3) e o grupo controle, por via retal com auxílio de um termômetro digital.

#### 3.6.3 Temperatura corporal após trauma (0', 10', 30', 60')

Além da aferição diária de temperatura, após indução do traumatismo cranioencefálico foram realizadas 4 aferições nos tempos: 0' (imediatamente após trauma), 10' (10 minutos após trauma), 30' (30 minutos após trauma) e 60" (1 hora após trauma), sendo os animais separados em grupo controle e grupo traumatismo cranioencefálico (TCE).

### 3.7 Testes comportamentais

#### 3.7.1 Teste de Reconhecimento de Objetos

Para a realização do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO), seguiu-se um modelo adaptado (ENNACEUR; DELACOUR, 1988, ANTUNES; BIALA, 2012). O TRO é um teste comportamental que se fundamenta no comportamento inato de exploração dos roedores, onde há uma tendência em explorar novos objetos em detrimento de objetos previamente apresentados, fornecendo assim, dados sobre memória de reconhecimento de curto e longo prazo (Figura 13).

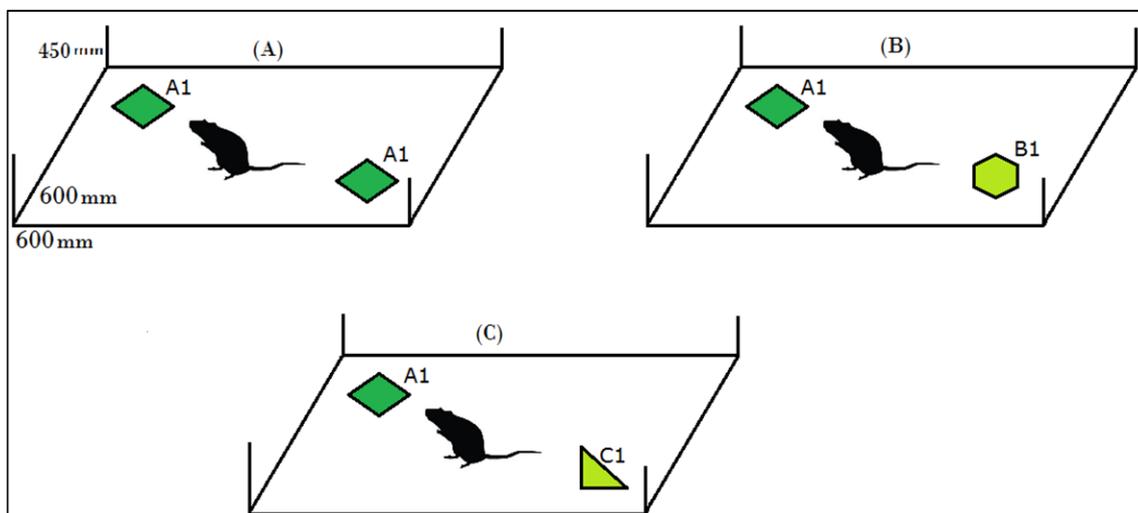


Figura 13. (A) Demonstração da sessão de treino utilizando objetos semelhantes A1 e A1'; (B) Demonstração de sessão de teste de memória de curto prazo, na qual A1 é um objeto previamente conhecido e B1 um objeto novo (C) Demonstração da sessão de teste de memória de longo prazo, na qual A1 é um objeto previamente conhecido e C1 um objeto novo. Fonte: do autor.

A caixa utilizada no teste é confeccionada em acrílico transparente, nas dimensões 600mm x 600mm x 450mm, revestida com papel adesivo preto em toda sua extensão (Figura 14). Todas as sessões foram gravadas utilizando o software ANY-maze Video Tracking System versão 7.1.



Figura 14: Caixa utilizada para testes comportamentais. Fonte: do autor

No primeiro dia de experimento, na habituação, os animais foram introduzidos na caixa de testes sem nenhum objeto, a fim de proporcionar exploração livre e habituação ao ambiente, por um período de 10 minutos. Após cada sessão realizada de habituação e teste, a caixa era higienizada com álcool 70%. Após 24 horas, na sessão de treino, os animais foram colocados na caixa com dois objetos idênticos (A1 e A1'). Os objetos foram dispostos a 15cm das paredes laterais. A sessão foi realizada num período de 5 minutos com livre exploração.

Uma hora e 30 minutos após o término do treino, foi avaliada a memória de curto prazo (MCP). Os animais que realizaram a sessão de treino, foram reposicionados na caixa com dois objetos (A1 e B1), sendo que um dos objetos (B1) foi apresentado pela primeira vez. A sessão foi realizada num período equivalente ao treino, de 5 minutos.

Vinte e quatro horas após a sessão treino, os animais foram colocados na caixa com dois objetos (A1 e C1), um previamente conhecido e um novo, para a avaliação da memória de longo prazo (MLP). A sessão foi realizada também num período de 5 minutos. Para a análise dos dados foi utilizado o índice de reconhecimento, através da fórmula  $IR = \frac{TN}{(TA+TN)} \times 100$ , na qual, TN é o tempo gasto para explorar o objeto novo e TA, o tempo gasto para explorar o objeto previamente conhecido. No presente estudo, foram avaliadas, através deste teste,

exclusivamente, a memória de curto e de longo prazo de animais dos grupos G0, G2 (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> dia) e G3 (5<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> dia). Os objetos utilizados nesse teste estão apresentados na Figura 15.



Figura 15: Objetos utilizados para o teste de reconhecimento de objetos. A1 e A1': Objetos semelhantes para a sessão de treinamento. B1: Novo objeto para a sessão de curto prazo. C1: Novo objeto para a sessão de longo prazo. Fonte: do autor

### 3.7.2 Campo Aberto

Para o teste de Campo Aberto, foi utilizada uma adaptação para a realidade do laboratório, do modelo introduzido pela primeira vez em 1934 (HALL, 1934). Este teste é amplamente utilizado e cujo objetivo é avaliar o comportamento animal em um ambiente de exploração livre. Comumente o teste do Campo Aberto é realizado para avaliar a atividade locomotora, através do monitoramento da distância total percorrida e do número de vezes que o animal se move em determinada região do aparato. Também, assim como parâmetros motores, especialmente locomoção, é possível avaliar comportamento tipo-ansioso, autolimpeza, imobilidade, dentre outros (MATHIASSEN; DICAMILLO, 2010).

A caixa utilizada no teste foi a mesma do Teste de Reconhecimento de Objetos, citado anteriormente (Figura 7). No primeiro dia do experimento, na

habituação, os animais foram alocados na caixa de experimentos por um período de 5 minutos com livre exploração. Após cada sessão realizada, tanto de habituação, quanto de teste, a caixa era higienizada com álcool 70%. 24 horas após a sessão de treino, o teste foi realizado também por um período de 5 minutos, permitindo a livre exploração do animal ao aparato. No presente estudo, foram avaliados através deste teste: (1) A distância total percorrida, (2) o tempo total de imobilidade e (3) O tempo na zona central do aparato. Todas as análises de comportamento do Campo Aberto também foram realizadas pelo Software ANY-maze Video Tracking System versão 7.1.

### **3.8 Coleta de tecido**

Após completados os dias de avaliação de cada grupo experimental, os animais foram eutanasiados através de decapitação por guilhotina e o cérebro foi prontamente dissecado para obtenção do Córtex Pré-frontal, Hipocampo e Hipotálamo. Este procedimento foi conduzido em superfície com resfriamento de 0-4°C para evitar degradação da amostra. Posteriormente os tecidos dissecados foram colocados em microtubos (Eppendorf) e acondicionados em freezer com capacidade de congelamento a -80°C.

### **3.9 Avaliação de estresse oxidativo**

#### **3.9.1 Ensaio dos produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)**

Os níveis de AOPP nos tecidos cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo) foram determinados de acordo com protocolo apresentado a seguir. Foram colocados 200 mg de amostra de tecido em um eppendorf cônico com capacidade de 2mL para homogeneização com 1,0 mL de água destilada. Após este processo as amostras foram centrifugadas a uma temperatura de 4°C com velocidade de 3.500 rpm por 10 minutos e apenas o sobrenadante foi recolhido. Foram pipetados diretamente em placa de Elisa (96 poços) 40 µL do sobrenadante e acrescentado 160 µL de PBS, 10 µL de KI e 20 µL de ácido acético glacial (ultrapuro). Para amostras do córtex pré-frontal foi utilizada uma diluição adicional de 10x em PBS. Já para amostras do hipocampo e hipotálamo, foi utilizada uma

diluição de 20x, também em PBS. As placas foram submetidas a agitação dupla-orbital de 6 minutos anterior à leitura. Imediatamente após o processo de agitação a leitura da placa foi realizada em comprimento de onda de 340 nm (Leitor de Microplacas - Multidetecção Híbrido Synergy® H1). A curva padrão para quantificar os níveis de AOPP foi feita com o uso de cloramina-T (0 a 100 µM). Todas as amostras foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em µM Cloramina T/mg tecido. Os valores foram corrigidos pelo peso das amostras utilizadas.

### **3.9.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para realizar o protocolo de peroxidação lipídica nos tecidos cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo) foram colocadas 100 mg de amostra de cada tecido avaliado em um microtubo do tipo eppendorf e homogeneizada em 500 µL de solução de ácido tricloroacético 15% adicionada ao hidroxitolueno butilado 45 nM. Após o processo de homogeneização, as amostras foram levadas ao banho seco com temperatura de 100°C por um período de 15 minutos. Assim que foram retiradas do banho seco as amostras foram rapidamente centrifugadas a uma velocidade de 14.000 rpm por um período de 2 minutos a uma temperatura de 4°C. Ao término do processo de centrifugação 300 µL do sobrenadante foram coletados e misturado com 300 µL de Ácido tiobarbitúrico 0,73% com as amostras ainda quentes. Rapidamente as amostras foram levadas novamente ao banho seco a 100°C por um período de 30 minutos. Em seguida foram pipetadas 150 µL do sobrenadante de cada amostra em triplicata em placa de Elisa e lida em comprimento de onda a 532 nm usando espectrofotômetro (Leitor de Microplacas - Multidetecção Híbrido Synergy® H1). A curva foi preparada em concentrações de 0µM-167µM malondialdeído (MDA). Para o cálculo da concentração de MDA em cada amostra utilizou-se a seguinte fórmula: Concentração de MDA (nmol) = [Absorbância a 532 nm/ (coeficiente de extinção molar do MDA x caminho óptico)] x diluição. Os valores foram corrigidos pelo peso da amostra utilizada (PUNTEL et al., 2007).

### **3.10 Análise estatística**

Para os valores de peso e temperatura, foi utilizado análise de variância

(ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, sendo os fatores peso ou temperatura e tempo (em dias) com os grupos controle e TCE (G3) e teste post-hoc de Tukey para o peso corporal e temperatura para que fossem feitas as comparações múltiplas. Nos dados de temperatura pós-trauma foi utilizada ANOVA de uma via para medidas repetidas e teste pos-hoc de Tukey. Para a análise de comportamento, foi utilizada ANOVA de uma via para amostras independentes com teste pos-hoc de Tukey. Para as análises bioquímicas de AOPP e TBARS, como também para os dados de expressão das proteínas pelo método de Western Blotting foi utilizada também ANOVA de uma via para medidas independentes com teste pos-hoc de Tukey. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o Software GraphPad Prism 9.5.1. Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Em todas as análises foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### Peso corporal

Durante 7 dias os animais dos grupos controle e TCE (G3) foram acompanhados e foram realizadas as pesagens diariamente, respeitando o mesmo período do dia para todas as medidas.

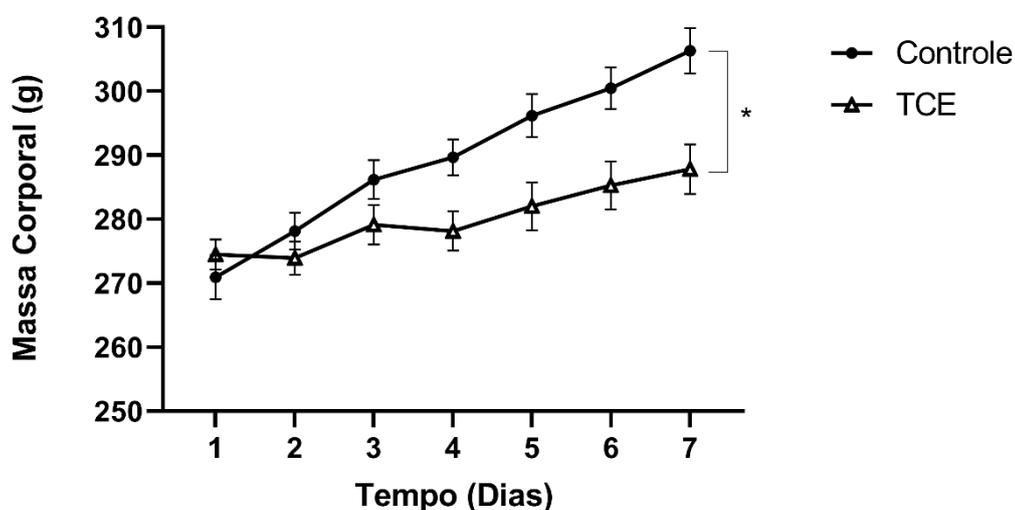


Figura 16: Gráfico de representação da massa corporal em relação ao tempo de 7 dias. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n=15$ ) por grupo. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, teste de Tukey para comparações múltiplas. \* $p<0,05$ .

Os animais submetidos a traumatismo cranioencefálico pelo modelo apresentado demonstraram, através de ANOVA de duas vias, um menor ganho de peso em relação ao grupo controle (G0:  $289,7 \pm 4,713$ , TBI:  $280,1 \pm 1,997$ ,  $F(1, 28) = 5.221$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 16). Os valores e análise de significância estatística estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 2).

|              | Controle         | TCE              | p       | n  |
|--------------|------------------|------------------|---------|----|
| <b>Dia 1</b> | 270,9 $\pm$ 3,42 | 274,5 $\pm$ 2,35 | >0,9999 | 15 |
| <b>Dia 2</b> | 278,1 $\pm$ 2,87 | 273,9 $\pm$ 2,60 | >0,9999 | 15 |
| <b>Dia 3</b> | 286,2 $\pm$ 3,04 | 279,1 $\pm$ 3,11 | 0,8078  | 15 |

|              |            |            |         |    |
|--------------|------------|------------|---------|----|
| <b>Dia 4</b> | 289,7±2,81 | 278,1±3,08 | 0,0693  | 15 |
| <b>Dia 5</b> | 296,2±3,39 | 282,0±3,74 | 0,0625  | 15 |
| <b>Dia 6</b> | 300,5±3,25 | 285,3±3,76 | 0,0343* | 15 |
| <b>Dia 7</b> | 306,3±3,57 | 287,8±3,89 | 0,0108* | 15 |

Tabela 2: Dados das comparações múltiplas de massa corporal em gramas durante avaliação em 7 dias. Valores das colunas Controle (A) e TCE (B) expressos em média ± EPM.

## Temperatura corporal pré e pós-trauma

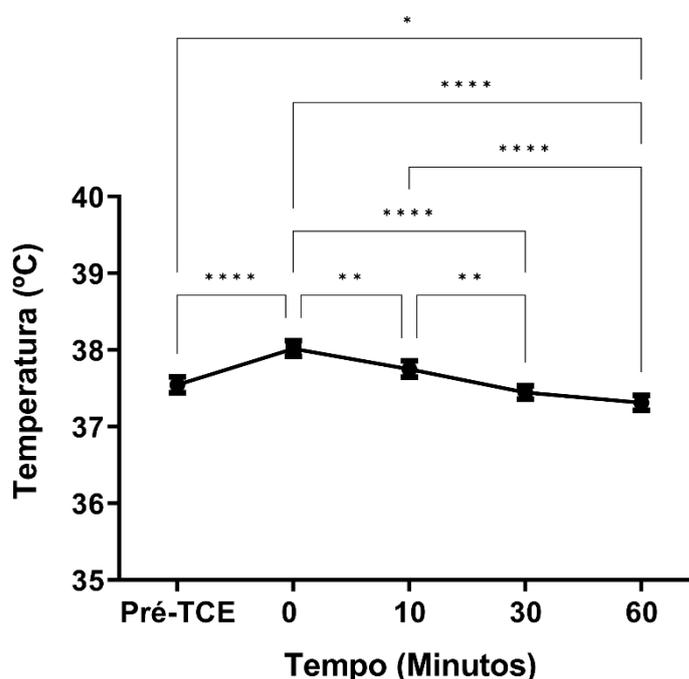


Figura 17: Gráfico de representação da temperatura retal pré e após traumatismo cranioencefálico em diferentes tempos. Dados apresentados como média ± EPM (n=15) por grupo. ANOVA de uma via para medidas repetidas, teste Tukey para comparações múltiplas. \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001.

Anteriormente e após serem submetidos ao traumatismo cranioencefálico, durante a primeira hora, foi aferida a temperatura retal em quatro tempos distintos: 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 60 minutos (Figura 17). Como controle foi utilizada a aferição de temperatura antes do TCE dos mesmos animais (PRÉ: 37,55 ± 0,10, 0': 38,02 ± 0,10, 10': 37,75 ± 0,11, 30': 37,45 ± 0,09, 60': 37,31 ± 0,10, F (4, 56) = 27,99, p < 0,0001). Imediatamente após o TCE, foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (p < 0,0001) em relação ao controle. Também foram

identificadas as diferenças entre os tempos 0 minutos e 10 minutos ( $p < 0,01$ ), 10 minutos e 30 minutos ( $p < 0,01$ ) e diminuição Pré-TCE e 60 minutos ( $p < 0,05$ ). Outras significâncias foram encontradas e demonstradas no gráfico acima. Em suma, após o TCE, a temperatura retal dos animais foi encontrada aumentada e durante a 1 hora de avaliação diminuiu gradativamente. Os animais demonstraram, aos 60 minutos, uma temperatura inferior ao Pré-TCE.

## Temperatura em dias

Assim como realizado com o peso corporal, foi aferida diariamente a temperatura por via retal dos animais durante o período de 7 dias.

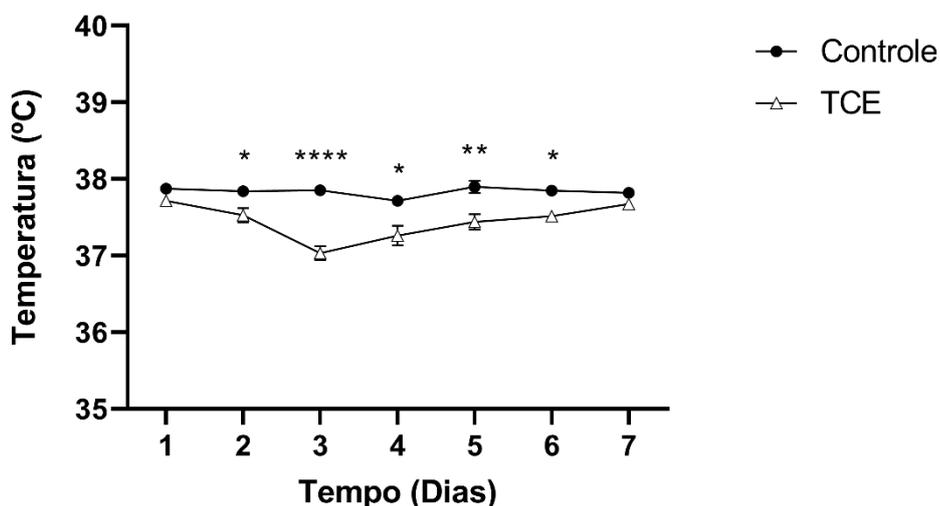


Figura 18: Gráfico de representação da temperatura retal em relação ao período de 7 dias. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n=15$ ) por grupo. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, teste Tukey para comparações múltiplas. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

O grupo de animais submetidos a traumatismo cranioencefálico (G3) demonstrou diminuição da temperatura corporal ( $^{\circ}\text{C}$ ) estatisticamente significativa do grupo TCE (Figura 18), quando comparado ao grupo controle (Controle/TCE:  $37,84 \pm 0,02/37,45 \pm 0,09$ ,  $F(1, 28) = 78,89$ ,  $p < 0,001$ ).

|  | Controle | TCE | p | n |
|--|----------|-----|---|---|
|  |          |     |   |   |

|              |            |            |          |    |
|--------------|------------|------------|----------|----|
| <b>Dia 1</b> | 37,87±0,06 | 37,71±0,08 | >0,9999  | 15 |
| <b>Dia 2</b> | 37,84±0,06 | 37,53±0,09 | 0,0413*  | 15 |
| <b>Dia 3</b> | 37,85±0,07 | 37,03±0,09 | <0,0001* | 15 |
| <b>Dia 4</b> | 37,71±0,07 | 37,26±0,13 | 0,0006*  | 15 |
| <b>Dia 5</b> | 37,90±0,08 | 37,44±0,10 | 0,0004*  | 15 |
| <b>Dia 6</b> | 37,85±0,06 | 37,51±0,07 | 0,0241*  | 15 |
| <b>Dia 7</b> | 37,82±0,05 | 37,67±0,07 | >0,9999  | 15 |

Tabela 3: Dados das comparações múltiplas de temperatura retal em °C durante avaliação em 7 dias. Valores das colunas Controle (A) e TCE (B) expressos em média ± EPM.

Na análise realizada, não foi possível detectar a diferença estatística dos grupos nos dias 1 e 7. Os valores individuais diários estão expostos na Tabela 3.

## Campo Aberto

### Distância Total Percorrida - Campo Aberto

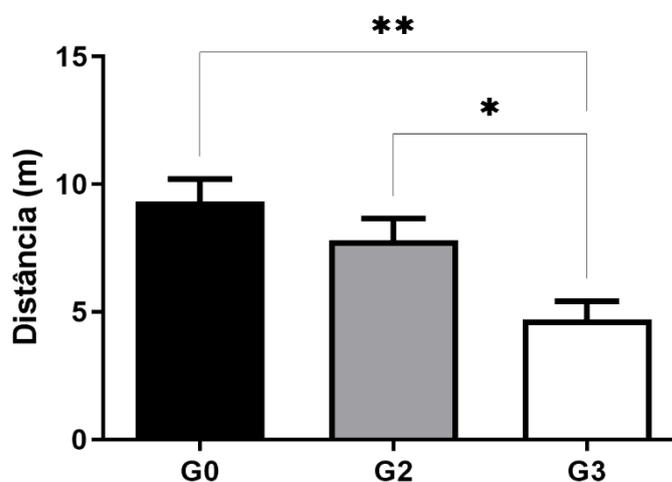


Figura 19: Gráfico de avaliação da distância total percorrida através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média ± EPM. (n= 8-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Para as análises comportamentais no Campo Aberto, foram avaliados os grupos Controle (G0), G2 (3 dias pós-trauma) e G3 (7 dias pós-trauma) (G0: 9,317 ± 0,89, G2: 7,801 ± 0,85, G3: 4,704 ± 0,71, F (2, 29) = 7,988, p = 0,0017). No parâmetro distância total percorrida (Figura 19), foi encontrada diferença

estatisticamente significativa entre os animais dos grupos Controle (G0) e G3 ( $p < 0,01$ ), tal como nos grupos G2 e G3 ( $p < 0,05$ ). Apesar de haver uma tendência, não foi possível identificar a diferença entre os grupos Controle e G2 ( $P > 0,05$ ).

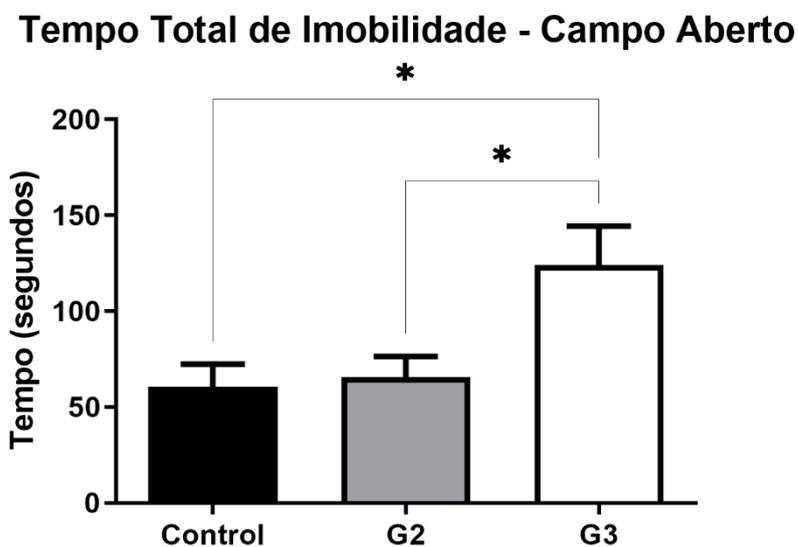


Figura 20: Gráfico de avaliação do tempo total de imobilidade através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-12$ ) por grupo. ANOVA de uma para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas.  $*p < 0,05$ .

Para a análise do tempo de imobilidade (Figura 20), os mesmos grupos foram avaliados (G0:  $60,59 \pm 11,8$ , G2:  $65,57 \pm 10,8$ , G3:  $123,9 \pm 20,46$ ,  $F(2, 29) = 5,073$ ,  $p = 0,0129$ ). Foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle e G3 ( $p < 0,05$ ) e G2 e G3 ( $p < 0,05$ ). Na presente amostra, não foi possível identificar diferenças entre o grupo G0 e G2 ( $p > 0,05$ ).

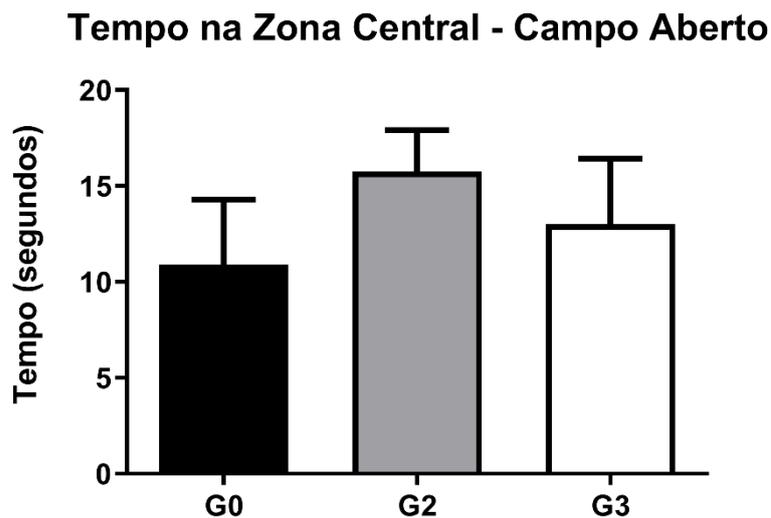


Figura 21: Gráfico de avaliação do tempo de permanência na zona central do aparato através do teste de campo aberto. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes.  $p=0,5$ .

Para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade foi utilizada a análise do tempo de permanência na zona central do aparato (Figura 21). Novamente, os mesmos grupos foram avaliados (G0:  $10,91 \pm 3,38$ , G2:  $15,75 \pm 2,2$ , G3:  $13,01 \pm 3,4$ ,  $F(2, 27) = 0,5529$ ,  $p = 0,58$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais desta análise.

### Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Os animais submetidos ao traumatismo cranioencefálico foram posteriormente avaliados quanto à sua memória de reconhecimento de curto (Figura 22) e longo prazo (Figura 23) em comparação ao grupo controle.

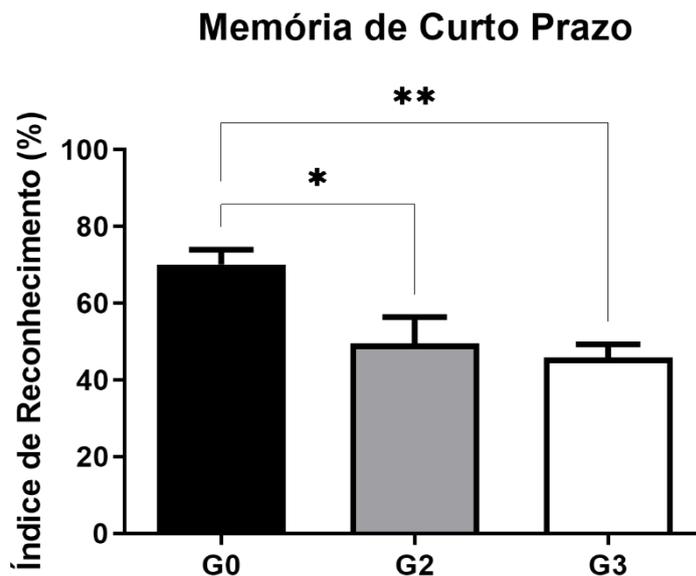


Figura 22: Gráfico de avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, realizada 1,5h após o treino. (n=10-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Nas análises da sessão de curto prazo (Figura 22), realizadas 90 minutos após a sessão treino, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) dos grupos G0 e G2 ( $p < 0,05$ ) e G0 e G3 ( $p < 0,01$ ) (G0:  $70,1 \pm 3,9\%$ , G2:  $49,5 \pm 6,9\%$ , G3:  $45,9 \pm 3,4\%$ ,  $F(2, 29) = 7,256$ ,  $p = 0,0028$ ). Além disso, os animais dos grupos que foram submetidos ao TCE, apresentaram índice de reconhecimento abaixo de 60%, considerado como um prejuízo da função cognitiva, enquanto o grupo controle, apresentou este índice maior que 70%, considerado uma função cognitiva adequada, de acordo com o paradigma de Ennaceur e Delacour (1988).

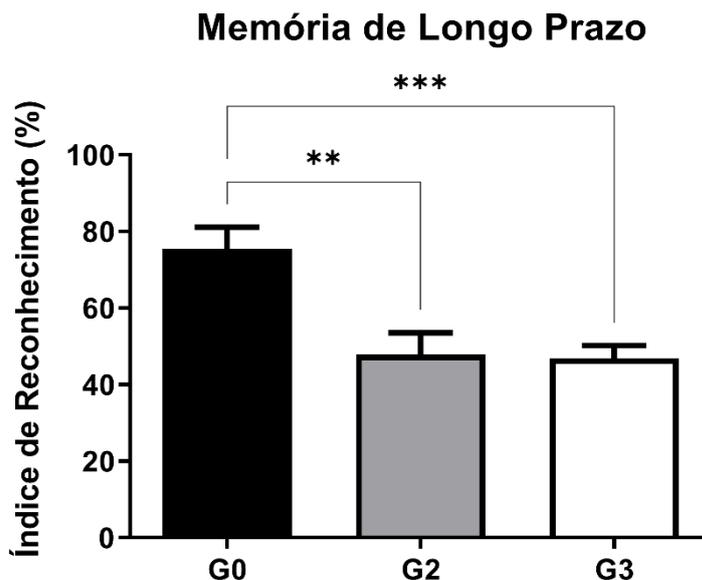


Figura 23: Gráfico de avaliação da memória de reconhecimento de longo prazo, realizada 24h após a sessão treino. (n= 10-12) por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Para as análises da sessão de longo prazo (Figura 23), que foi realizada 24 horas após a sessão treino, foi demonstrada uma diferença significativa dos grupos G0 e G2 ( $P < 0,01$ ) e G0 e G3 ( $p < 0,001$ ) através da ANOVA de uma via (G0:  $75,5 \pm 5,6\%$ , G2:  $47,9 \pm 5,7\%$ , G3:  $46,85 \pm 3,3\%$ ,  $F(2, 29) = 10,94$ ,  $p = 0,0003$ ). O prejuízo na função cognitiva dos grupos G2 e G3 foi também encontrado no teste de longo prazo. Em ambas as avaliações, não foi possível encontrar diferença entre os grupos submetidos a TCE (G2 e G3).

### **Ensaio dos produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)**

Para analisar os níveis de estresse oxidativo, a oxidação proteica foi avaliada através do ensaio de AOPP. No córtex pré-frontal (Figura 24), foram encontrados níveis elevados de oxidação proteica, expresso por  $\mu\text{M}$  Cloramina-T/mg tecido nos grupos G2 e G3, submetidos a TCE, em comparação ao grupo controle (G0:  $4,120 \pm 0,54$ , G1:  $4,980 \pm 0,74$ , G2:  $9,360 \pm 0,55$ , G3:  $7,980 \pm 0,79$ ,  $F(3, 16) = 13,83$ ,  $p = 0,0001$ ). Não foi possível identificar diferenças nos grupos G0 e G1.

### AOPP C3rteX Pr3-frontal

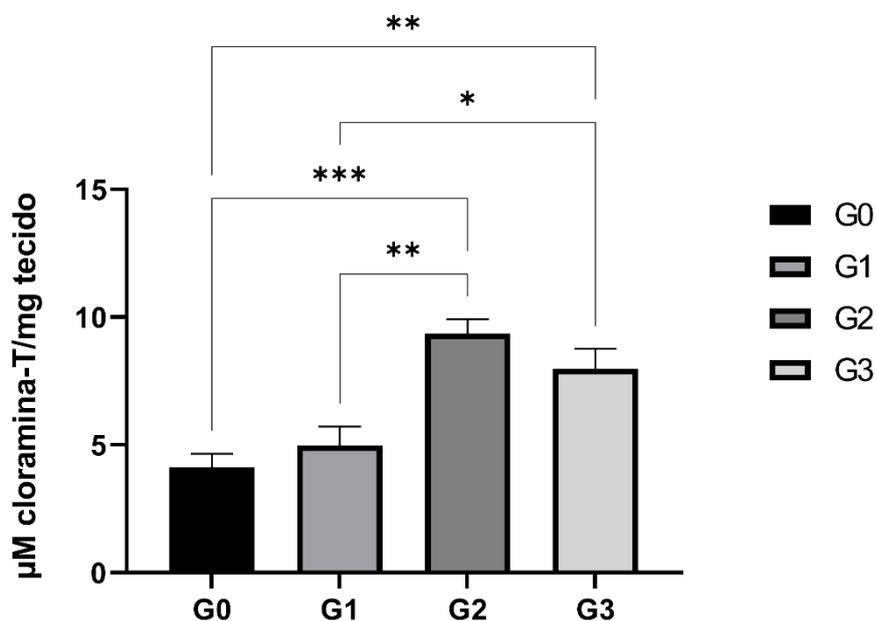


Figura 24: Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no córtex pré-frontal.  $n = 5$  por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

No hipocampo (Figura 25), os níveis de AOPP, foram elevados em todos os grupos submetidos a TCE (G0:  $9,900 \pm 0,82$ , G1:  $12,60 \pm 1,26$ , G2:  $15,88 \pm 1,04$ , G3:  $15,28 \pm 2,05$ ,  $F(3, 13) = 3,825$ ,  $p = 0,0365$ ), porém, apenas o grupo G2 demonstrou diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (G0).

### AOPP Hipocampo

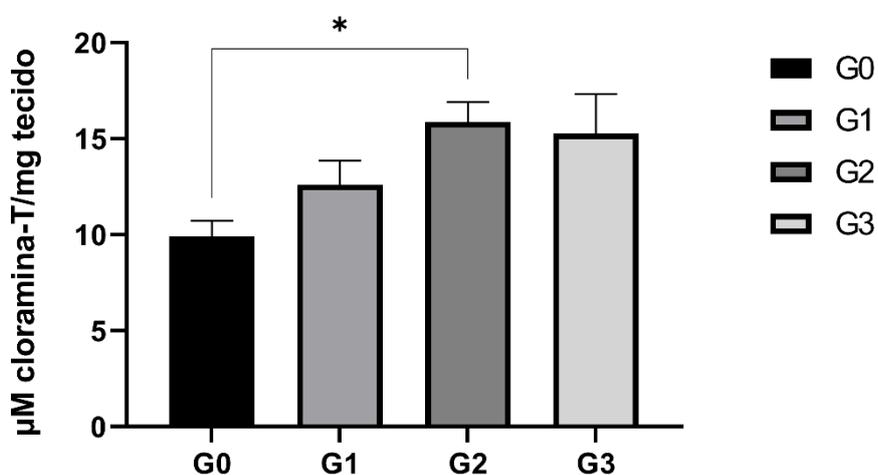


Figura 25: Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no hipocampo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \*p<0,05.

Já no hipotálamo, os níveis de AOPP foram encontrados aumentados nos grupos G2 e G3, em relação ao controle (G0: 15,48 ± 1,46, G1: 9,00 ± 2,67, G2: 23,48 ± 1,78, G3: 23,76 ± 1,11, F (3, 14) = 15,53, p < 0,0001)

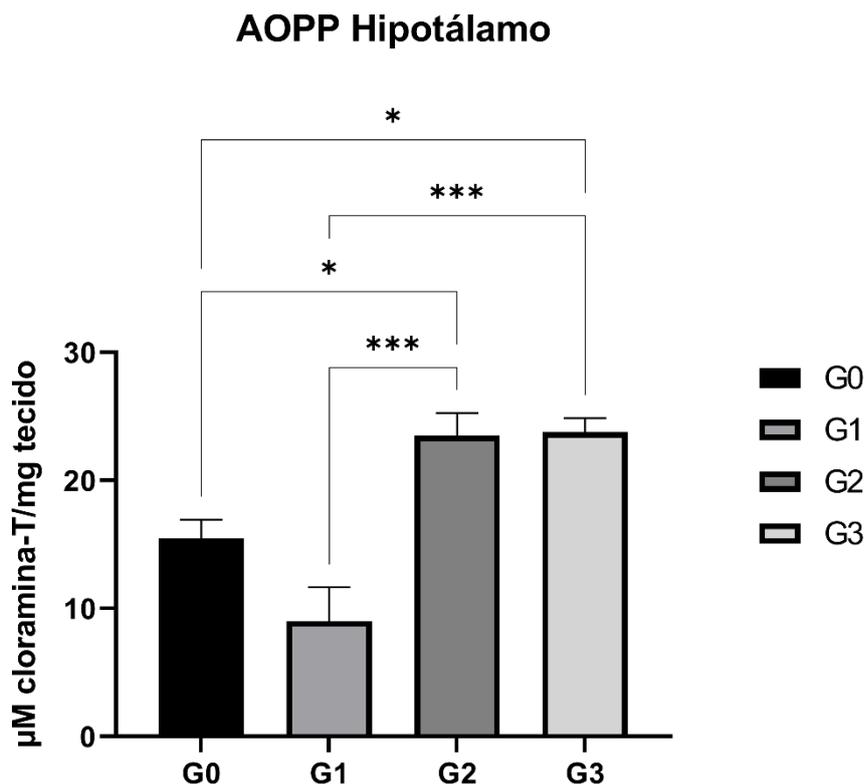


Figura 26: Gráfico de avaliação dos níveis de oxidação proteica no hipotálamo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

### Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica, foi utilizado o ensaio de TBARS. Os níveis de TBARS no córtex pré-frontal (Figura 27), expressos em μM Malondialdeído/g tecido, foram encontrados aumentados em comparação ao grupo controle, embora, apenas os grupos G2 e G3, apresentaram diferença significativa (G0: 5,420 ± 0,37, G1: 6,120 ± 0,86, G2: 9,700 ± 1,09, G3: 12,35 ± 1,678, F (3, 14) = 9,816, p = 0,001).

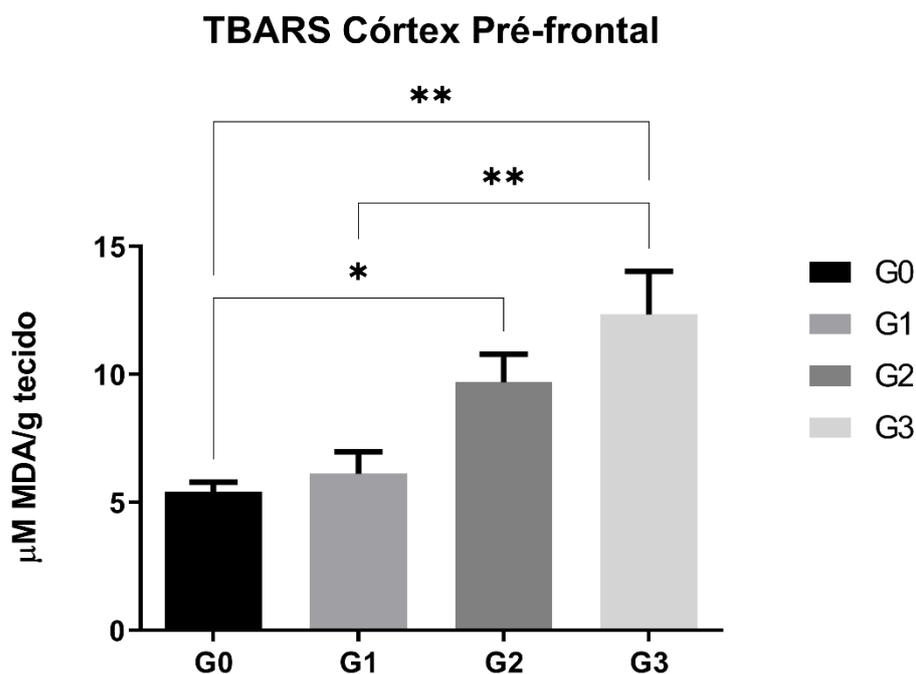


Figura 27: Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

No hipocampo (Figura 28), todos os três grupos submetidos ao TCE apresentaram níveis de TBARS aumentados, estatisticamente significantes, em comparação ao grupo controle (G0:  $15,32 \pm 0,53$ , G1:  $18,48 \pm 0,51$ , G2:  $19,36 \pm 0,71$ , G3:  $18,32 \pm 0,86$ ,  $F(3, 15) = 6,844$ ,  $p = 0,004$ ). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos submetidos ao TCE.

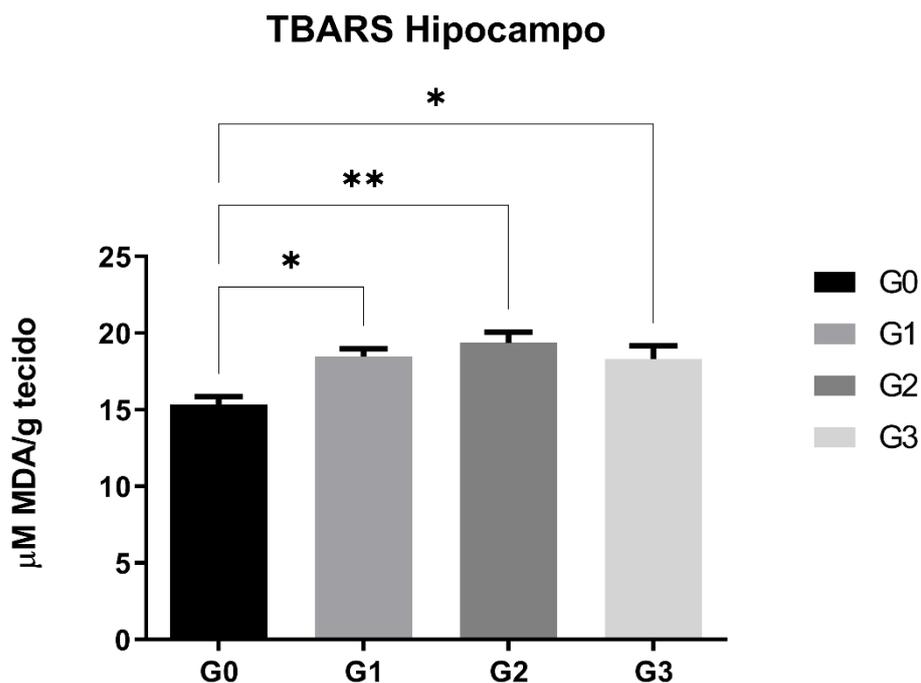


Figura 28: Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo. n = 4-5 por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

No hipotálamo (Figura 29), os grupos G1 e G2 apresentaram níveis de peroxidação lipídica maior que o grupo controle, embora apenas o grupo G2 tenha expressado diferença estatisticamente significativa (G0:  $26,86 \pm 1,68$ , G1:  $37,00 \pm 2,94$ , G2:  $40,03 \pm 3,779$ , G3:  $27,73 \pm 2,19$ ,  $F(3, 13) = 6,210$ ,  $p = 0,0075$ ). Ademais, foi encontrada significativa entre os grupos submetidos ao TCE, G2 e G3 ( $p < 0,05$ ).

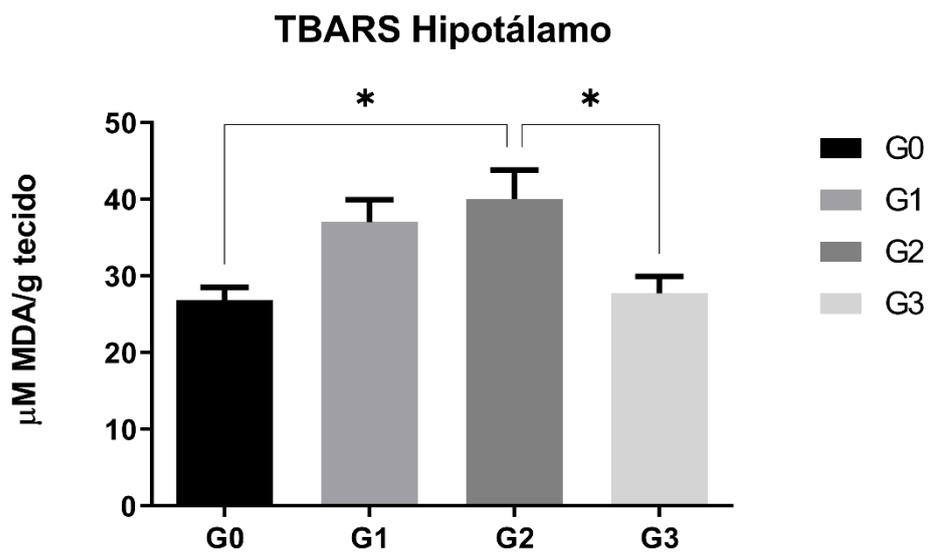


Figura 29: Gráfico de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no hipotálamo.  $n = 4-5$  por grupo. ANOVA de uma via para amostras independentes, teste Tukey para comparações múltiplas,  $*p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi evidenciado que o aparato de indução a TCE do modelo *Weight-drop* utilizando projéteis em ratos Wistar adultos-jovens foi capaz de mimetizar achados também encontrados em estudos com humanos, fazendo assim com que possa ser considerado um modelo candidato para estudos translacionais. O TCE causado pelo modelo desenvolvido foi capaz de causar alterações comportamentais e demonstrou déficits nos testes de memória de curto e longo prazo (TRO) e na atividade motora (CA). Além disso, observamos o aumento expressivo de parâmetros associados ao estresse oxidativo, de oxidação proteica e peroxidação lipídica, especialmente nos dias 3 e 7 após-trauma em regiões cerebrais como o córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo. Ademais, animais que foram submetidos a TCE apresentaram menor ganho de peso ao longo de uma semana de avaliação e, apresentaram menor temperatura corporal (retal) no 3º dia pós-trauma, culminando com o pico inflamatório.

### **Aparato e Modelo de Traumatismo Cranioencefálico**

Como citado anteriormente, o primeiro modelo de TCE foi descrito por Feeney e colaboradores (1981). Neste modelo, era realizado craniotomia, permanecendo a dura-máter intacta e exposta. O peso era liberado em queda livre de encontro a um instrumento de metal, que produzia o TCE. Após esse dispositivo, dezenas de outros aparatos do modelo *Weight-drop* foram descritos e utilizados. O modelo apresentado por esse trabalho possui características que o torna pertencente a essa classificação de modelos (*Weight-drop*), porém é inovador no que se diz respeito ao utilizar um projétil e utilizar ratos com nenhum tipo de intervenção cirúrgica antes da indução do TCE. Rana e colaboradores (2020), descreveram um modelo *Weight-drop* utilizando um disco de metal implantado entre o lambda e o bregma do animal. Além disso, na base do aparato foi colocada uma camada de espuma, para que a energia do impacto fosse difundida. Os modelos que apresentam essas características, tornam complexa a reprodução desses aparatos (MA et al., 2019).

O modelo *Weight-drop* é considerado o modelo mais próximo em relação ao TCE humano (ALBERT-WEISSENBERGER; SIRÉN, 2010). Os métodos de indução a TCE desse modelo que foram descritos na literatura, em sua grande maioria, são adaptações dos modelos pioneiros (FEENEY et al., 1981, MA et al., 2019). Diversos desses modelos realizam intervenções cirúrgicas (e.g. craniotomia ou abertura do escalpo) e outras formas de intervenção, como a remoção do pelo da cabeça dos animais, implante de “capacetes” de metal para difusão da energia da queda de peso, entre outros (NAJEM et al., 2018). Todas essas modificações, em nossa visão, distanciam o modelo do seu propósito inicial, que é reproduzir, de forma mais fiel possível, o TCE humano.

Uma das principais vantagens do modelo apresentado, em comparação com os já descritos na literatura, é a grande reprodutibilidade, não só entre animais, mas também entre laboratórios, devido à simplicidade para a construção do aparato. Além disso, pela capacidade de modificação da massa do projétil, se torna um modelo capaz de se adaptar às diversas finalidades de gravidade das lesões. Modelos de TCE de cabeça-fechada são capazes de desenvolver déficits e alterações de comportamento e achados semelhantes aos apresentados por pacientes com TCE. Até o momento, como previamente descrito, existem inúmeras variações do modelo *Weight-drop* para induzir TCE, porém, até onde sabemos, este é o primeiro a usar projéteis em modelo de queda de peso de cabeça fechada para induzir TCE moderadamente grave em ratos. Portanto, neste estudo, desenvolvemos um aparato de TCE modelo *Weight-drop* de cabeça fechada que é capaz de causar lesão focal utilizando a restrição da cabeça do animal. Isso permite a visualização e avaliação de parâmetros vitais e uma ampla gama de resultados sem intervenção cirúrgica. Conforme mencionado, manter intacto o crânio ou couro cabeludo dos animais antes do TCE pode mimetizar resultados mais próximos do TCE humano (KAHRIMAN et al., 2021).

## **O Traumatismo Cranioencefálico**

Os animais submetidos a TCE pelo modelo do estudo demonstraram padrões de interação social e ambulação normais nas suas gaiolas-casa durante o período de avaliação (3 ou 7 dias). Além disso, por observação, suas funções urinária e

intestinal permaneceram de forma similar aos animais do grupo controle.

O desenho experimental proposto foi desenvolvido a partir da necessidade da validação do modelo e também devido a poucos estudos descreverem alterações na cognição desses animais no curto prazo. O período agudo pós-trauma, é, por muitos, considerado a janela crítica para um desfecho favorável ou desfavorável, tanto em modelos animais quanto em humanos (VELLA; CRANDALL; PATEL, 2017, PAVLOVIC et al., 2019). Por essa razão, nosso trabalho buscou compreender como o TCE pode alterar os parâmetros estudados nesse período.

A classificação de gravidade da lesão causada por modelos de TCE, pode ser feita de diversas formas. A *Neurobehaviour Severity Scale* (NSS) é um dos critérios mais utilizados para a avaliação de gravidade do TCE em modelos experimentais. Uma das principais limitações do uso dessa escala, na qual se enquadra o motivo da não utilização para caracterizar a gravidade no presente estudo, é a necessidade de utilização de anestésicos inalatórios, visto que as primeiras sessões de avaliação devem ser feitas minutos ou poucas horas após a indução do TCE (FLIERL et al., 2009, STELFA et al., 2022). Além disso, existem formas de avaliação feitas por histologia do tecido encefálico (FRANK et al., 2021) e pela mortalidade causada (KOCHANNEK et al., 2017). Com os dados obtidos nesse trabalho, utilizamos a classificação pela mortalidade como parâmetro para indicar que a lesão causa é moderadamente grave. Essa classificação, não tão usual a partir do que preconiza a literatura, que normalmente separa apenas em TCE leve, moderado e grave, provém dos dados de mortalidade apresentados pelo projétil utilizado no estudo. Com 14,2% de óbitos dos animais em nosso trabalho, o parâmetro de comparação foi a mortalidade encontrada em TCE humano. Cerca de 20% dos casos graves de crianças e adultos que são acometidos por TCE vão a óbito e em casos leves a moderados, possuem mortalidade que vão de 0-10% (KENNEDY et al., 2022). Portanto, por possuir mortalidade maior que os casos moderados e menor que os graves, será utilizado o termo moderadamente grave.

### **Parâmetros Vitais**

Um achado importante do estudo foi a diferença de ganho de massa corporal

durante o período de avaliação entre os grupos controle e TCE. É possível fazer a inferência de que a diferença entre o ganho de massa corporal dos grupos está relacionada às consequências agudas causadas pelo traumatismo cranioencefálico, tais como possíveis fraturas de crânio e hemorragias. Fatores como os citados anteriormente e também a menor atividade motora demonstrada pelos resultados deste estudo pelo teste de campo aberto, são possíveis fatores para essa diferença, principalmente no período após o pico inflamatório (3º dia). Kahrیمان e colaboradores, em 2022, relacionam a perda de peso em modelos animais de TCE, com os danos agudos provenientes da lesão, assim como o observado em nosso estudo. Além disso, é evidenciado nesse trabalho que a perda de peso do grupo TCE comparativa ao grupo controle é relacionada com maiores déficits cognitivos e o tempo de recuperação de reflexos avaliados (KAHRIMAN et al., 2022). Ryu e colaboradores (2021), demonstraram perda de massa corporal em roedores 1 dia após TCE. A perda de peso mais expressiva apresentada, pode ser explicada, além dos danos provenientes do TCE, pela realização de intervenções cirúrgicas prévias à indução do TCE, visto que ambos os grupos, tratado com buprenorfina e salina (controle) apresentam menor peso corporal (RYU et al., 2021).

Outro importante achado no nosso estudo foi a avaliação feita na temperatura corporal (retal) dos grupos experimentais propostos. Na avaliação da temperatura pré e pós-trauma, o súbito aumento da temperatura pós-trauma pode ser explicado principalmente por dois fatores: (I) o dano primário da lesão, podendo afetar locais diretamente ligados com o controle da temperatura corporal, especialmente o hipotálamo na sua região pré-óptica, e (II) por aumento do tônus simpático, causando aumento da temperatura corporal e aumento de produção de glicocorticóides e de corticosterona (WASSERMAN et al., 2020, THOMPSON, 2003). Da mesma forma, além do possível dano hipotalâmico que poderia ocasionar a flutuação da temperatura, a posterior diminuição da temperatura pode ser explicada por mecanismos autorregulatórios que fazem além da regulação da pressão intracraniana em relação a pressão arterial, a modulação da temperatura indiretamente através de dilatação ou constrição dos vasos e consequente modulação energética (CHILDS, 2008; SACHO; CHILDS, 2008, GOWDA; JAFFA; BADHJATIA, 2018, HUANG et al., 2009). Ademais, os dados de 60' corroboram os

dados encontrados no segundo dia de aferição da temperatura corporal.

No TCE, a hipotermia é uma das principais condições presentes e pode significar uma série de sinais em pacientes, especialmente hemorragia (VAN VEELLEN; MAEDER, 2021). Em nosso modelo, encontramos a temperatura dos animais submetidos a TCE diminuída em relação ao grupo controle nos dias 2 a 6 pós-trauma. Inferimos que a possível causa da hipotermia pode ser explicada pelo dano hipotalâmico agudo e que persiste durante quase todo o período de avaliação. O dano hipotalâmico e nas demais áreas afetadas pelo impacto do projétil pode, segundo o processo fisiopatológico descrito (BLAYLOK; MAROON, 2011), causar dano e disfunção mitocondrial, tanto pelo impacto, quanto pelo processo de estresse oxidativo, corroborado também por nossos resultados. O dano mitocondrial, é uma das principais características dos danos secundários provenientes do TCE, sendo assim, com a disfunção na cascata de respiração celular e subsequente menor produção de ATP, podendo gerar a diminuição da capacidade metabólica, causando hipotermia (HAKIMINIA et al., 2022). Ademais, o possível dano hipotalâmico, pode gerar flutuação na regulação da temperatura corporal (VAN VELEEN; MAEDER, 2021). Corroborando com nossa hipótese, o dia de hipotermia mais pronunciada (3º pós-trauma), culmina com o dia do pico de inflamação do presente modelo, motivo esse que estaria dificultando o processo de fosforilação oxidativa e aumentando o dano mitocondrial. Além disso, nossos dados de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no hipotálamo, exibem valores maiores no 3º dia pós-trauma.

A literatura acerca da hipotermia no TCE, de forma geral, é baseada na hipotermia terapêutica, cuja realização é considerada por muitos uma forma efetiva de proteção contra danos (LI et al., 2021; LIU et al., 2022). Eroglu e colaboradores (2017), utilizando ratos Wistar machos, sugerem que a hipotermia pós-TCE pode exercer uma função neuroprotetora, pois a diminuição tanto da temperatura corporal, quanto da temperatura encefálica, diminui marcadores das vias de apoptose, como a das caspases (EROGLU et al., 2017). Além disso, Zhang e colaboradores, sugerem que a hipotermia moderada induzida em animais pós-TCE atenuam a função inflamatória mediada por micróglia (ZHANG et al., 2018). Em suma, nossos achados revelam que os processos de recuperação da função

termorreguladora de animais traumatizados ao longo dos dias de avaliação, pode sinalizar, a proteção contra mecanismos inflamatórios.

### **Traumatismo Cranioencefálico e Alterações Comportamentais**

No presente estudo, dois testes comportamentais foram realizados, teste do campo aberto (CA) e teste de reconhecimento de objetos (TRO). No CA, foram avaliados três parâmetros: distância total percorrida, tempo total de imobilidade e tempo na zona central.

No parâmetro de distância percorrida, os achados do estudo demonstram diminuição da ambulação no aparato no G3 (7 dias pós-trauma) e, apesar de não significativa, uma clara redução para o grupo G2 (3 dias pós-trauma) foi também observada. Nossos achados estão de acordo com o estudo de Chen e colaboradores que demonstraram uma diminuição na locomoção de animais 3 dias após o TCE (CHEN et al., 2022). Ademais, corrobora os achados de Walter e colaboradores (2022), quando no 7º dia pós lesão, foi encontrada uma locomoção diminuída no teste de CA. Corroborando com os dados apresentados de distância total percorrida, o tempo de imobilidade em animais traumatizados no 7º dia pós-lesão foi maior que o dobro do tempo em relação ao grupo controle. Também em concordância com os demais achados, déficits motores e/ou comportamentais em modelos de traumatismo cranioencefálico são mais comuns no fim do período agudo e início do período subagudo (a partir do 8º dia) após a injúria (LITOFISKY, 2018). Em parcial discordância com o apresentado anteriormente, num estudo utilizando um modelo de TCE repetidos, evidenciam que lesões múltiplas são capazes de gerar alterações locomotoras e em comportamentos relacionados a ansiedade num período de 5 dias pós-lesão (BROUSSAD et al., 2018). Portanto, podemos inferir, a partir das análises do tempo de imobilidade e distância total percorrida pelos animais, que os déficits locomotores são evidenciados e podem estar relacionados às sequelas dos danos secundários do TCE.

Apesar de não ter sido demonstrada a diferença após TCE, os resultados apresentados estão de acordo com estudos previamente realizados da literatura, onde mesmo 9 dias após o TCE, não foram encontradas alterações no

comportamento relacionado a ansiedade. (FRIEDMAN-LEVI et al., 2021). Déficits comportamentais do tipo-ansioso, tornam-se mais evidentes no período crônico, 4 semanas da injúria (BOYKO, 2022), fato este corroborado por dados clínicos (ESTEROV et al., 2022). Um dos motivos para tal, como descrito anteriormente, é a ocorrência de uma cascata fisiopatológica de neuroinflamação mediada por células da glia, persistente durante meses após TCE (MOUZON et al., 2014). Fato este, que ao culminar num processo de excitotoxicidade crônica, causa disfunção neuronal principalmente nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo, apresentadas no estudo (BOYKO et al., 2022). O estudo de Broussad, com repetidas lesões, expressa também um comportamento do tipo-ansioso durante um período de 5 dias, fato este que infere que a fisiopatologia do TCE pode ser ligeiramente diferente em casos de lesões únicas e múltiplas (BROUSSAD et al., 2018).

No TRO, com os achados do estudo, revela-se que os animais traumatizados apresentam déficit cognitivo, especialmente da memória de reconhecimento, de curto e longo prazo, corroborando com dados apresentados por Feng e colaboradores (2021) e demais estudos (MORAWSKA et al., 2016, QUBTY et al., 2018). Salienta-se que este é um processo intimamente ligado à interação funcional do córtex pré-frontal e o hipocampo (WABURTON; BROWN, 2015). Destaca-se, entretanto, que poucos estudos até o presente momento relatam déficits cognitivos no período agudo da lesão em modelos de TCE de cabeça fechada (EAKIN et al., 2014, HO et al., 2021). Além disso, ressalta-se que o local de impacto do projétil do presente modelo (bregma) situa-se ligeiramente anterior em relação à estrutura hipocampal, fato este que explicaria um possível dano primário estrutural e, posteriormente, funcional causado a essa estrutura ligada, dentre outras funções, à consolidação e evocação da memória.

Joyce e colaboradores (2019), revelam a perspectiva do impacto do TCE na cognição e na atividade motora de pacientes que apresentam sintomas da doença de Parkinson, e evidenciam que as sequelas mais tardias do TCE são ligadas diretamente a cognição, porém não foi encontrada associação direta com os sintomas motores. Em estudo avaliando a memória de reconhecimento 3 e 6 meses

após TCE, foi demonstrada a diminuição expressiva do índice de reconhecimento (GRIFFITHS et al., 2022). Utilizando a definição fisiopatológica dos comportamentos tipo-ansioso, a cognição, especificamente a memória de reconhecimento, também são encontradas em períodos mais distantes da injúria. Isso se deve ao fato dos danos secundários e a disfunção da conectividade córtex pré-frontal-hipocampo, mediado pelos mecanismos previamente citados e ao estresse oxidativo aumentado, como mostram nossos resultados (WABURTON; BROWN, 2015). Em suma, foi demonstrado no presente trabalho, um modelo capaz de causar déficits cognitivos persistindo até o final do período agudo de avaliação. Portanto, a partir das análises realizadas pelos testes comportamentais, por demonstrar semelhanças com o que é visto em pacientes acometidos por TCE, o presente modelo mostra-se relevante para estudos translacionais.

### **Traumatismo Cranioencefálico e Níveis de Estresse Oxidativo**

Ao avaliarmos os níveis de dano oxidativo dos grupos experimentais propostos, analisamos a oxidação proteica e a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo. A oxidação proteica, medida pelo teste de AOPP, foi encontrada aumentada nas regiões cerebrais propostas, nas avaliações dos grupos de 3 e 7 dias após o TCE. No grupo de 1 hora pós trauma, não foi possível detectar diferenças nos níveis de oxidação proteica. Apenas um estudo de 2021 foi encontrada usando os descritores “*traumatic brain injury*” e “*AOPP*”. Nesse trabalho de Montiviero e colaboradores (2021), foram avaliados os níveis de AOPP nos tempos de 60 minutos, 24 horas e 7 dias após TCE no córtex pré-frontal, córtex motor e hipocampo. Seus achados demonstram concordância com os resultados apresentados em nosso estudo, visto que nos períodos avaliados, os níveis de AOPP se encontram acima dos valores do grupo controle, no córtex e hipocampo (MONTIVIERO et al., 2021). Além disso, diferente do que foi encontrado em nosso trabalho, Montiviero relata que os níveis de AOPP decaem ao longo dos dias durante uma semana, chegando ao 7º dia de avaliação com níveis menores que ao período de 24h. Nossos achados demonstram que o nível de oxidação proteica apenas diminui ligeiramente, porém sem significância estatística ou permanece similar em relação ao 3º dia pós-trauma. Esse resultado, está de acordo com os demais resultados apresentados, visto que principalmente após o 3º dia de

avaliação, os déficits encontrados são maiores, especialmente na cognição, que o grupo G3 (7 dias pós-trauma) apresenta pior desempenho na tarefa de reconhecimento.

Considerando que o sistema nervoso central, e principalmente o cérebro, possui proteínas cujas funções são de extrema importância para o equilíbrio da função (e.g. receptores, enzimas, transportadores), o dano oxidativo às proteínas pode significar uma disfunção e um processo excitotóxico continuado, acarretando diversas alterações, como as vistas nos resultados apresentados da alteração na cognição e locomotora dos animais submetidos a TCE (KHATRI et al., 2018).

A peroxidação lipídica, medida pelo teste de TBARS, foi encontrada aumentada em padrões diferentes entre as áreas avaliadas. No córtex pré-frontal, apesar de haver aumento no grupo de 1 hora após TCE, não foram encontradas diferenças significantes. Porém, é visto um grande crescimento nos níveis de TBARS no dia 3 e ainda maior no dia 7 pós-TCE. No hipocampo, os níveis de peroxidação lipídica, mostram-se aumentados em todos os grupos submetidos a TCE, sem diferença estatística entre eles, sugerindo um dano continuado a essa estrutura. No hipotálamo, é visto um aumento expressivo dos níveis de TBARS no 3º dia pós-trauma, culminando com a condição hipotérmica apresentada nos resultados anteriores. Além disso, é visto uma diminuição desses níveis comparando os grupos de 3 e 7 dias depois da indução do TCE. Esses achados no hipotálamo, estão de acordo com a normalização da temperatura corporal retal dos animais, onde já não são vistas diferenças entre o grupo TCE e grupo controle (Figura 18).

Ozturk e colaboradores (2021), evidenciaram um aumento de TBARS em ratos Wistar macho, 5 dias após TCE e diminuído em relação ao tratamento proposto com modafinil. Esses dados, de certa forma, estão de acordo com nossos achados, pois, apesar de não avaliarmos o 5º dia após a lesão, temos um aumento expressivo no 3º e 7º dia no córtex pré-frontal e hipocampo. Por outro lado, diversos estudos utilizando diferentes métodos de indução a TCE, demonstram aumento dos níveis de TBARS nas primeiras horas após a lesão (ANSARI; ROBERTS; SCHEFF, 2013, PETRONILHO et al., 2010, YANG et al., 2014). Além disso, alguns desses métodos realizam intervenção cirúrgica anterior ao TCE, que por si só, pode ser um estressor, como dito anteriormente, pode ocorrer a modificação da cascata de

eventos fisiopatológicos a partir do método utilizado (YILDIRIM et al., 2005). Em pacientes, os níveis de TBARS no soro e no líquido, mostraram-se aumentados nos períodos agudos e crônicos após lesão, sendo esse um importante preditor de prognóstico (MUBALLE et al., 2016, WANG et al., 2016, HOHL et al., 2012). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram, também pelos parâmetros de peroxidação lipídica, uma importante concordância entre outros estudos realizados em pacientes.

Em suma, o sistema nervoso central é um local altamente suscetível à ocorrência do processo de estresse oxidativo, uma vez que demanda alto consumo de oxigênio e nutrientes como glicose e lactato. O SNC contém um alto teor de ácidos graxos e estruturas lipídicas, o que também leva ao aumento do estresse oxidativo (LIRIO et al., 2022), principalmente após lesões traumáticas. A alta concentração de espécies reativas de oxigênio pode levar ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, diminuição da sinaptogênese e neuroplasticidade e também disfunção mitocondrial, devido aos processos de peroxidação lipídica pela ligação de radicais livres a estruturas funcionais primordiais do sistema nervoso central (LIRIO et al., 2022).

### **Limitações do estudo**

A principal limitação do estudo é relacionada ao período de avaliação do desenho experimental realizado. Por escolhermos a janela aguda pós-TCE, alguns comportamentos relacionados a doenças neuropsiquiátricas, como ansiedade e depressão, cuja incidência pós-TCE em médio a longo prazo são grandes, não foram observadas no presente estudo. Outra limitação foi a não avaliação de parâmetros inflamatórios. Muitos dos mecanismos subjacentes aos resultados apresentados, são pautados na fisiopatologia do TCE. A neuroinflamação proveniente do TCE, é provavelmente, a sinalização mais pronunciada e fonte dos danos comportamentais e cognitivos provenientes dos danos secundários.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como próximo objetivo da linha de pesquisa (em andamento), abordaremos três biomarcadores associados ao TCE: BDNF (Brain derived neurotrophic factor/Fator neurotrófico derivado do cérebro), S100B e enolase específica neuronal. A modulação dessas moléculas, a partir de um evento neurotraumático, pode ser sinal da ocorrência de eventos patofisiológicos específicos.

O BDNF é a neurotrofina mais abundante no SNC e sua ação está associada a sobrevivência e manutenção neuronal, como o brotamento dendrítico e a sinaptogênese. No córtex pré-frontal e hipocampo, exerce funções intimamente ligadas a regulação do humor e processos cognitivos (GUSTAFSSON et al., 2021). No TCE, a expressão das diversas isoformas do BDNF pode exercer um importante papel na sinalização da gravidade da injúria, ainda que este fato seja divergente entre os estudos. O aumento da expressão de BDNF maduro (BDNFm) pós-lesão pode indicar a capacidade de atenuação dos danos secundários, promovendo ação neuroprotetora. Além disso, um possível aumento da isoforma pro-BDNF, pode indicar possíveis alterações cognitivas (CHEN et al., 2016). Porém, diversos outros estudos, relacionam a diminuição ou a não alteração das isoformas do BDNF à gravidade de lesão causada (LIN; KUO; LUH, 2021). Portanto, devido à grande importância da ação dessa neurotrofina, pretende-se com pesquisas futuras a elucidação da participação do BDNF no modelo apresentado.

A proteína B ligante de cálcio (S100B) é um importante fator neurotrófico relacionado a homeostase de neurônios e células da glia. Este fator é principalmente expressado por astrócitos ligados a vasos sanguíneos no SNC e atualmente é um importante marcador de ruptura da barreira hematoencefálica (BAECKER et al., 2020, WANG et al., 2018). Estudos pré-clínicos utilizando amostras do córtex e do sangue de roedores submetidos a TCE, demonstram o aumento de S100B. Do mesmo modo, utilizando o sangue de pacientes acometidos por TCE, Vos e colaboradores (2010), evidenciaram que a S100B é um importante preditor de mortalidade, podendo auxiliar o prognóstico quando associado a parâmetros clínicos.

A enolase específica neuronal (NSE) é uma isoenzima encontrada em neurônios, cuja função é catalisar a reação de conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato na via glicolítica (ISGRÒ; BOTTONI; SCATENA, 2015). Os níveis de NSE no sangue periférico podem indicar dano neuronal agudo, visto que seus valores numa situação de homeostase são desprezíveis. Em pacientes acometidos por TCE, os níveis séricos de NSE encontraram-se aumentados numa janela curta pós-lesão e são relacionados a desfechos desfavoráveis e/ou óbito (CHENG et al., 2014). Por outro lado, em casos de TCE crônico foram encontrados níveis séricos de NSE abaixo da linha de base, possivelmente refletindo possíveis sinais de atrofia cerebral (BAGNATO et al., 2020). Devido à grande participação na via glicolítica e por ser especificamente encontrada em neurônios, a dosagem de NSE pode ser um importante marcador de gravidade relacionada ao TCE.

Além disso, como outro objetivo, também já em processo de realização, pesquisaremos a ação um fármaco com potencial neuroprotetor nas alterações cognitivas relacionadas ao TCE, o canabidiol. O canabidiol é o principal fitocanabinóide não-psicotomimético presente na Cannabis Sativa (CAMPOS et al., 2016). Desde seu descobrimento em 1940 (ADDAMS; HUNT; CLARK, 1940) e posteriores descobertas do sistema endocanabinóide (EC), evidenciam uma importante e promissora ação, sobretudo em doenças neuropsiquiátricas (ELSAID; KLOIBER; LE FOLL, 2019). Apesar dessa diversidade de possibilidades terapêuticas, seu mecanismo de ação, até os dias atuais não está completamente elucidado (PENG et al., 2022). Tanto devido a vastidão de receptores que é capaz de exercer ação direta e/ou indireta, quanto pela complexidade do tônus endocanabinóide envolvido. Portanto, propõe-se uma como objetivo futuro a avaliação aguda da recuperação cognitiva de ratos submetidos a TCE e posteriormente tratados com Canabidiol, a fim de elucidar possíveis efeitos neuroprotetores e neuroplásticos desse fitocanabinóide na cascata fisiopatológica do TCE.

## 7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que presente modelo é capaz de induzir traumatismo cranioencefálico em ratos jovens-adultos e causar déficits e alterações similares aos encontrados em pacientes, sendo um candidato para estudos translacionais. O TCE, em nosso modelo, foi capaz de causar alteração nos parâmetros de ganho de massa corporal e temperatura, especialmente a partir do 3º dia pós-trauma. Concluímos também, que o modelo foi capaz de promover alterações comportamentais, especialmente no desempenho cognitivo e locomotor, avaliado pela memória de curto e longo prazo e avaliação da distância percorrida, respectivamente. Por fim, concluímos que os animais submetidos a TCE, sofreram dano oxidativo, por meio da oxidação proteica e peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo. Esses achados são importantes para o entendimento das alterações do TCE na janela aguda da lesão, e, por suas características, permite a busca por novas terapias, intervenções e janelas de oportunidade.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Adamovich-Zeitlin R, Wanda PA, Solomon E, et al. Biomarkers of memory variability in traumatic brain injury. *Brain Commun.* 2020;3(1):fcaa202. Published 2020 Dec 15. doi:10.1093/braincomms/fcaa202
2. Adams R, Hunt M & Clark JH. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wils Hemp. *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1): 196–200, 1940
3. Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010 Aug 13;2(1):16. doi: 10.1186/2040-7378-2-16. PMID: 20707892; PMCID: PMC2930598.
4. Alkhaibary A, Alshalawi A, Althaqafi RMM, et al. Traumatic Brain Injury: A Perspective on the Silent Epidemic. *Cureus.* 2021;13(5):e15318. Published 2021 May 29. doi:10.7759/cureus.15318
5. Almeida CE, de Sousa Filho JL, Dourado JC, Gontijo PA, Dellaretti MA, Costa BS. Traumatic Brain Injury Epidemiology in Brazil. *World Neurosurg.* 2016;87:540-547. doi:10.1016/j.wneu.2015.10.020
6. Andrade, A. F. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online]. 2009, v. 55, n. 1, pp. 75-81. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302009000100020>.
7. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Dose- and time-dependent neuroprotective effects of Pycnogenol following traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2013 Sep 1;30(17):1542-9. doi: 10.1089/neu.2013.2910. Epub 2013 Jul 17. PMID: 23557184; PMCID: PMC3751204.
8. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012;13(2):93-110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
9. Areas FZ, Schwarzbald ML, Diaz AP, et al. Predictors of Hospital Mortality and the Related Burden of Disease in Severe Traumatic Brain Injury: A Prospective Multicentric Study in Brazil. *Front Neurol.* 2019;10:432. Published 2019 Apr 25. doi:10.3389/fneur.2019.00432
10. Bagnato S, Andriolo M, Boccagni C, et al. Reduced Neuron-Specific Enolase Levels in Chronic Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2020;37(2):423-427. doi:10.1089/neu.2019.6449
11. Baecker J, Wartchow K, Sehm T, Ghoochani A, Buchfelder M, Kleindienst A. Treatment with the Neurotrophic Protein S100B Increases Synaptogenesis after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2020;37(8):1097-1107. doi:10.1089/neu.2019.6475

12. Beschorner R, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Meyermann R, Simon P. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 2007; 22:515– 526. doi:10.1002/cne.21667
13. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(1):3-18. doi:10.1111/nan.12011
14. Boyko M, Gruenbaum BF, Shelef I, et al. Traumatic brain injury-induced submissive behavior in rats: link to depression and anxiety. *Transl Psychiatry*. 2022;12(1):239. Published 2022 Jun 7. doi:10.1038/s41398-022-01991-1
15. Brett BL, Gardner RC, Godbout J, Dams-O'Connor K, Keene CD. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. *Biol Psychiatry*. 2022;91(5):498-507. doi:10.1016/j.biopsych.2021.05.025
16. Broussard JI, Acion L, De Jesús-Cortés H, Yin T, Britt JK, Salas R, Costa-Mattioli M, Robertson C, Pieper AA, Arciniegas DB, Jorge R. Repeated mild traumatic brain injury produces neuroinflammation, anxiety-like behaviour and impaired spatial memory in mice. *Brain Inj*. 2018;32(1):113-122. doi: 10.1080/02699052.2017.1380228. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29156991.
17. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3(0 3):305-315. doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.020
18. Campos AC, Fogaça MV, Sonogo AB, Guimarães FS. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res*. 112:119-127, 2016.
19. Campos AC, Fogaça MV, Scarante FF, et al. Plastic and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Front Pharmacol*. 2017;8:269. Published 2017 May 23. doi:10.3389/fphar.2017.00269
20. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Med Clin North Am*. 2020;104(2):213-238. doi:10.1016/j.mcna.2019.11.001
21. Carlson AP, Hänggi D, Macdonald RL, Shuttleworth CW. Nimodipine Reappraised: An Old Drug With a Future. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(1):65-82. doi:10.2174/1570159X17666190927113021
22. Carney N, Totten AM, O'Reilly C, et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery*. 2017;80(1):6-15. doi:10.1227/NEU.0000000000001432

23. Carteri RBK, Silva RAD. Traumatic brain injury hospital incidence in Brazil: an analysis of the past 10 years. *Incidência hospitalar de traumatismo craniencefálico no Brasil: uma análise dos últimos 10 anos. Rev Bras Ter Intensiva.* 2021;33(2):282-289. doi:10.5935/0103-507X.20210036
24. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3344. Published 2020 May 8. doi:10.3390/ijms21093344
25. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx.* 2005;2(3):410-422. doi:10.1602/neurorx.2.3.410
26. Chen H, Chan YL, Nguyen LT, et al. Moderate traumatic brain injury is linked to acute behaviour deficits and long term mitochondrial alterations. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(11):1107-1114. doi:10.1111/1440-1681.12650
27. Chen T, Liu WB, Ren X, Li YF, Li W, Hang CH, Wang YH. Whole Body Vibration Attenuates Brain Damage and Neuroinflammation Following Experimental Traumatic Brain Injury. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Apr 7;10:847859. doi: 10.3389/fcell.2022.847859. PMID: 35465331; PMCID: PMC9022659.
28. Cheng F, Yuan Q, Yang J, Wang W, Liu H. The prognostic value of serum neuron-specific enolase in traumatic brain injury: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(9):e106680. Published 2014 Sep 4. doi:10.1371/journal.pone.0106680
29. Cheng X, Wang J, Sun X, Shao L, Guo Z, Li Y. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. *J Integr Neurosci.* 2019;18(2):203-215. doi:10.31083/j.jin.2019.02.110
30. Childs C. Human brain temperature: regulation, measurement and relationship with cerebral trauma: part 1. *Br J Neurosurg.* 2008 Aug;22(4):486-96. doi: 10.1080/02688690802245541. PMID: 18649158.
31. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):9-29. doi:10.1038/s41582-019-0284-z
32. Davis CK, Vemuganti R. Antioxidant therapies in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 2022;152:105255. doi:10.1016/j.neuint.2021.105255
33. Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, Greig NH, Wang JY. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2016 Oct 15;272:38-49. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.06.018. Epub 2016 Jul 2. PMID: 27382003; PMCID: PMC5201203.
34. Dever A, Powell D, Graham L, et al. Gait Impairment in Traumatic Brain

- Injury: A Systematic Review. *Sensors (Basel)*. 2022;22(4):1480. Published 2022 Feb 14. doi:10.3390/s22041480
35. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury [published online ahead of print, 2018 Apr 1]. *J Neurosurg*. 2018;1-18. doi:10.3171/2017.10.JNS17352
- Dixon KJ. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2017;28(2):215-225. doi:10.1016/j.pmr.2016.12.001
36. Eakin K, Baratz-Goldstein R, Pick CG, et al. Efficacy of N-acetyl cysteine in traumatic brain injury. *PLoS One*. 2014;9(4):e90617. Published 2014 Apr 16. doi:10.1371/journal.pone.0090617
37. Elsaid S, Kloiber S, Le Foll B. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;167:25-75.
38. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31(1):47-59. doi:10.1016/0166-4328(88)90157-x
39. Eroğlu O, Deniz T, Kisa Ü, Atasoy P, Aydinuraz K. Effect of hypothermia on apoptosis in traumatic brain injury and hemorrhagic shock model. *Injury*. 2017 Dec;48(12):2675-2682. doi: 10.1016/j.injury.2017.09.032. Epub 2017 Sep 28. PMID: 29061477.
40. Esterov D, Witkowski J, McCall DM, Wi CI, Weaver AL, Brown AW. Risk factors for development of long-term mood and anxiety disorder after pediatric traumatic brain injury: a population-based, birth cohort analysis. *Brain Inj*. 2022;36(6):722-732. doi:10.1080/02699052.2022.2077987
41. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*. 1981;211(1):67-77. doi:10.1016/0006-8993(81)90067-6
42. Feldmann LK, Le Priault F, Felzen V, et al. Proteasome and Autophagy-Mediated Impairment of Late Long-Term Potentiation (l-LTP) after Traumatic Brain Injury in the Somatosensory Cortex of Mice. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):3048. Published 2019 Jun 21. doi:10.3390/ijms20123048
43. Feng Y, Li K, Roth E, et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in Rats Impairs Cognition, Enhances Prefrontal Cortex Neuronal Activity, and Reduces Pre-synaptic Mitochondrial Function. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:689334. Published 2021 Aug 10. doi:10.3389/fncel.2021.689334
44. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1328-37. doi: 10.1038/nprot.2009.148. Epub 2009 Aug 27. PMID: 19713954.

45. Fournier ML, Clément T, Aussudre J, Plesnila N, Obenaus A, Badaut J. Contusion Rodent Model of Traumatic Brain Injury: Controlled Cortical Impact. *Methods Mol Biol.* 2021;2193:49-65. doi:10.1007/978-1-0716-0845-6\_6
46. Frank D, Gruenbaum BF, Shelef I, Zvenigorodsky V, Benjamin Y, Shapoval O, Gal R, Zlotnik A, Melamed I, Boyko M. A Novel Histological Technique to Assess Severity of Traumatic Brain Injury in Rodents: Comparisons to Neuroimaging and Neurological Outcomes. *Front Neurosci.* 2021 Oct 13;15:733115. doi: 10.3389/fnins.2021.733115. PMID: 34720861; PMCID: PMC8549653.
47. Friedman-Levi Y, Liraz-Zaltsman S, Shemesh C, Rosenblatt K, Kesner EL, Ginberg G, Carmichael ST, Silva AJ, Shohami E. Pharmacological blockers of CCR5 and CXCR4 improve recovery after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2021 Apr;338:113604. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113604. Epub 2021 Jan 14. PMID: 33453212.
48. Gowda R, Jaffa M, Badjatia N. Thermoregulation in brain injury. *Handb Clin Neurol.* 2018;157:789-797. doi: 10.1016/B978-0-444-64074-1.00049-5. PMID: 30459041.
49. Graham NS, Sharp DJ. Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(11):1221-1233. doi:10.1136/jnnp-2017-317557
50. Griesbach GS, Tio DL, Nair S, Hovda DA. Temperature and heart rate responses to exercise following mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2013 Feb 15;30(4):281-91. doi: 10.1089/neu.2012.2616. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23009619; PMCID: PMC3579384.
51. Griffiths DR, Law LM, Young C, Fuentes A, Truran S, Karamanova N, Bell LC, Turner G, Emerson H, Mastroeni D, Gonzales RJ, Reaven PD, Quarles CC, Migrino RQ, Lifshitz J. Chronic Cognitive and Cerebrovascular Function after Mild Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma.* 2022 Oct;39(19-20):1429-1441. doi: 10.1089/neu.2022.0015. PMID: 35593008.
52. Gustafsson D, Klang A, Thams S, Rostami E. The Role of BDNF in Experimental and Clinical Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3582. Published 2021 Mar 30. doi:10.3390/ijms22073582
53. Hakiminia B, Alikiaii B, Khorvash F, Mousavi S. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury: From mechanistic view to targeted therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol.* 2022 Aug;36(4):612-662. doi: 10.1111/fcp.12767. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35118714.

54. Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>.
55. Hergert DC, Robertson-Benta C, Sicard V, et al. Use of Medical Cannabis to Treat Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2021;38(14):1904-1917. doi:10.1089/neu.2020.7148
56. Ho MH, Yen CH, Hsieh TH, Kao TJ, Chiu JY, Chiang YH, Hoffer BJ, Chang WC, Chou SY. CCL5 via GPX1 activation protects hippocampal memory function after mild traumatic brain injury. *Redox Biol*. 2021 Oct;46:102067. doi: 10.1016/j.redox.2021.102067. Epub 2021 Jul 17. PMID: 34315111; PMCID: PMC8327355.
57. Hohl A, Gullo Jda S, Silva CC, Bertotti MM, Felisberto F, Nunes JC, de Souza B, Petronilho F, Soares FM, Prediger RD, Dal-Pizzol F, Linhares MN, Walz R. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: a multivariate analysis. *J Crit Care*. 2012 Oct;27(5):523.e11-9. doi: 10.1016/j.jcrc.2011.06.007. Epub 2011 Jul 30. PMID: 21803537.
58. Hu M, Zhu D, Zhang J, et al. Enhancing endocannabinoid signalling in astrocytes promotes recovery from traumatic brain injury. *Brain*. 2022;145(1):179-193. doi:10.1093/brain/awab310
59. Huang T, Solano J, He D, Loutfi M, Dietrich WD, Kuluz JW. Traumatic injury activates MAP kinases in astrocytes: mechanisms of hypothermia and hyperthermia. *J Neurotrauma*. 2009 Sep;26(9):1535-45. doi: 10.1089/neu.2008.0743. PMID: 19331517; PMCID: PMC6468954.
60. Huie JR, Mondello S, Lindsell CJ, et al. Biomarkers for Traumatic Brain Injury: Data Standards and Statistical Considerations. *J Neurotrauma*. 2021;38(18):2514-2529. doi:10.1089/neu.2019.6762
61. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:125-143. doi:10.1007/978-94-017-7215-0\_9
62. Jamjoom AAB, Rhodes J, Andrews PJD, Grant SGN. The synapse in traumatic brain injury. *Brain*. 2021;144(1):18-31. doi:10.1093/brain/awaa321
63. Joyce JM, Monchi O, Ismail Z, Kibreab M, Cheetham J, Kathol I, Sarna J, Martino D, Debert CT. The impact of traumatic brain injury on cognitive and neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease. *Int Rev Psychiatry*. 2020 Feb;32(1):46-60. doi: 10.1080/09540261.2019.1656177. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31631720.
64. Kahriman A, Bouley J, Smith TW, Bosco DA, Woerman AL, Henninger N. Mouse closed head traumatic brain injury replicates the histological tau

- pathology pattern of human disease: characterization of a novel model and systematic review of the literature. *Acta Neuropathol Commun.* 2021 Jun 29;9(1):118. doi: 10.1186/s40478-021-01220-8. PMID: 34187585; PMCID: PMC8243463.
65. Kahriman A, Bouley J, Bosco DA, Shazeeb MS, Henninger N. Differential association of baseline body weight and body-weight loss with neurological deficits, histology, and death after repetitive closed head traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2022; 771:136430. doi:10.1016/j.neulet.2021.136430
66. Kalish BT, Whalen MJ. Weight Drop Models in Traumatic Brain Injury. *Methods Mol Biol.* 2016;1462:193-209. doi:10.1007/978-1-4939-3816-2\_12
67. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):692-702. doi:10.1111/bph.13125
68. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018;17(9):689-695. doi:10.2174/1871527317666180627120501
69. Kennedy L, Nuno M, Gurkoff GG, Nosova K, Zwienenberg M. Moderate and severe TBI in children and adolescents: The effects of age, sex, and injury severity on patient outcome 6 months after injury. *Front Neurol.* 2022 Aug 3;13:741717. doi: 10.3389/fneur.2022.741717. PMID: 35989939; PMCID: PMC9382186.
70. Khellaf A, Khan DZ, Helmy A. Recent advances in traumatic brain injury. *J Neurol.* 2019;266(11):2878-2889. doi:10.1007/s00415-019-09541-4
71. Kim H, Kim YT, Song ES, et al. Changes in the gray and white matter of patients with ischemic-edematous insults after traumatic brain injury [published online ahead of print, 2018 Oct 1]. *J Neurosurg.* 2018;1-11. doi:10.3171/2018.5.JNS172711
72. Kochanek PM, Wallisch JS, Bayır H, Clark RSB. Pre-clinical models in pediatric traumatic brain injury-challenges and lessons learned. *Childs Nerv Syst.* 2017 Oct;33(10):1693-1701. doi: 10.1007/s00381-017-3474-2. Epub 2017 Sep 6. PMID: 29149385; PMCID: PMC5909721.
73. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:99-103. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2\_9
74. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 2019;131:126-132. doi:10.1016/j.wneu.2019.07.039

75. Lei, J., Gao, G., Feng, J. et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study. *Crit Care* 19, 362 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1081-8>
76. Li J, Wang X, Qin S. Molecular mechanisms and signaling pathways of reactive astrocytes responding to traumatic brain injury. *Histol Histopathol.* 2021;36(9):921-929. doi:10.14670/HH-18-338
77. Li Z, Zhang H, Cao C, Qian T, Li H. Gangliosides combined with mild hypothermia provides neuroprotection in a rat model of traumatic brain injury. *Neuroreport.* 2021 Sep 8;32(13):1113-1121. doi: 10.1097/WNR.0000000000001703. PMID: 34284446.
78. Liu C, Sun X, Cai Y, Li D, Li B, Gao R, Zhang L, Chen G. Pramipexole alleviates traumatic brain injury in rats through inhibiting necroptosis. *Neurosci Lett.* 2022 Nov 20;791:136911. doi: 10.1016/j.neulet.2022.136911. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36243204.
79. Lin PH, Kuo LT, Luh HT. The Roles of Neurotrophins in Traumatic Brain Injury. *Life (Basel).* 2021;12(1):26. Published 2021 Dec 24. doi:10.3390/life12010026
80. Litofsky NS, Miller DC, Chen Z, et al. Anaemia worsens early functional outcome after traumatic brain injury: a preliminary study. *Brain Inj.* 2018;32(3):342-349. doi:10.1080/02699052.2018.1425913
81. LoBue C, Munro C, Schaffert J, et al. Traumatic Brain Injury and Risk of Long-Term Brain Changes, Accumulation of Pathological Markers, and Developing Dementia: A Review. *J Alzheimers Dis.* 2019;70(3):629-654. doi:10.3233/JAD-190028
82. Lozano A, Franchi F, Seastres RJ, et al. Glucose and Lactate Concentrations in Cerebrospinal Fluid After Traumatic Brain Injury. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2020;32(2):162-169. doi:10.1097/ANA.0000000000000582
83. Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 2019 Aug;56(8):5332-5345. doi: 10.1007/s12035-018-1454-5. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30603958.
84. Magalhães, Ana Luísa Gonçalves et al. Traumatic brain injury in Brazil: an epidemiological study and systematic review of the literature. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2022, v. 80, n.4 <https://doi.org/10.1590/0004-282X-ANP-2021-0035>.
85. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994 Feb;80(2):291-300. doi: 10.3171/jns.1994.80.2.0291. PMID: 8283269.

86. Maroon JC, Lepere DB, Blaylock RL, Bost JW. Postconcussion syndrome: a review of pathophysiology and potential nonpharmacological approaches to treatment. *Phys Sportsmed*. 2012;40(4):73-87. doi:10.3810/psm.2012.11.1990
87. Mathiasen JR, DiCamillo A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010;Chapter 5:. doi:10.1002/0471141755.ph0559s49
88. Mattson, M. P. (2019). Excitotoxicity. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*, 125–134. doi:10.1016/b978-0-12-813146-6.00011-4
89. McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2016;27(4):397-407. doi:10.1016/j.nec.2016.06.002
90. McNamara EH, Grillakis AA, Tucker LB, McCabe JT. The closed-head impact model of engineered rotational acceleration (CHIMERA) as an application for traumatic brain injury pre-clinical research: A status report. *Exp Neurol*. 2020;333:113409. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113409
91. Michinaga S, Koyama Y. Pathophysiological Responses and Roles of Astrocytes in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6418. Published 2021 Jun 15. doi:10.3390/ijms22126418
92. Miyazaki S, Katayama Y, Lyeth BG, et al. Enduring suppression of hippocampal long-term potentiation following traumatic brain injury in rat. *Brain Res*. 1992;585(1-2):335-339. doi:10.1016/0006-8993(92)91232-4
93. Montivero AJ, Gherzi MS, Silvero C MJ, Artur de la Villarmois E, Catalan-Figueroa J, Herrera M, Becerra MC, Hereñú CB, Pérez MF. Early IGF-1 Gene Therapy Prevented Oxidative Stress and Cognitive Deficits Induced by Traumatic Brain Injury. *Front Pharmacol*. 2021 Jun 21;12:672392. doi:10.3389/fphar.2021.672392. PMID: 34234671; PMCID: PMC8255687.
94. Morawska MM, Büchele F, Moreira CG, Imbach LL, Noain D, Baumann CR. Sleep Modulation Alleviates Axonal Damage and Cognitive Decline after Rodent Traumatic Brain Injury. *J Neurosci*. 2016;36(12):3422-3429. doi:10.1523/JNEUROSCI.3274-15.2016
95. Mouzon BC, Bachmeier C, Ferro A, et al. Chronic neuropathological and neurobehavioral changes in a repetitive mild traumatic brain injury model. *Ann Neurol*. 2014;75(2):241-254. doi:10.1002/ana.24064
96. Muballe KD, Sewani-Rusike CR, Longo-Mbenza B, Iputo J. Predictors of recovery in moderate to severe traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2018 Nov 1:1-10. doi: 10.3171/2018.4.JNS172185. Epub ahead of print. PMID: 30497133.
97. Muccigrosso MM, Ford J, Benner B, et al. Cognitive deficits develop

- 1 month after diffuse brain injury and are exaggerated by microglia-associated reactivity to peripheral immune challenge. *Brain Behav Immun.* 2016;54:95-109. doi:10.1016/j.bbi.2016.01.009
98. Najem D, Rennie K, Ribocco-Lutkiewicz M, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers. *Biochem Cell Biol.* 2018;96(4):391-406. doi:10.1139/bcb-2016-0160
99. Nakagawa A, Manley GT, Gean AD, et al. Mechanisms of primary blast-induced traumatic brain injury: insights from shock-wave research. *J Neurotrauma.* 2011;28(6):1101-1119. doi:10.1089/neu.2010.1442
100. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia.* 2016;64(2):300-316. doi:10.1002/glia.22930
101. Pavlovic D, Pekic S, Stojanovic M, Popovic V. Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary.* 2019 Jun;22(3):270-282. doi: 10.1007/s11102-019-00957-9. PMID: 30929221.
102. Peng J, Fan M, An C, Ni F, Huang W, Luo J. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022 130(4):439-456.
103. Petersen A, Soderstrom M, Saha B, Sharma P. Animal models of traumatic brain injury: a review of pathophysiology to biomarkers and treatments. *Exp Brain Res.* 2021;239(10):2939-2950. doi:10.1007/s00221-021-06178-6
104. Petronilho F, Feier G, de Souza B, Guglielmi C, Constantino LS, Walz R, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative stress in brain according to traumatic brain injury intensity. *J Surg Res.* 2010 Dec;164(2):316-20. doi: 10.1016/j.jss.2009.04.031. Epub 2009 May 19. PMID: 19691993.
105. Polich G, Iaccarino MA, Zafonte R. Psychopharmacology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol.* 2019;165:253-267. doi:10.1016/B978-0-444-64012-3.00015-0
106. Puntel RL, Roos DH, Paixão MW, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chem Biol Interact.* 2007 Jan 30;165(2):87-98. doi: 10.1016/j.cbi.2006.11.003. Epub 2006 Nov 23. PMID: 17188671.
107. Qubty, D., Glazer, S., Schrieber, S., Rubovitch, V, and Pick, C.G. Mild Traumatic Brain Injuries and Object Recognition. In: *Handbook of Object Novelty Recognition.* (Eds Ennaceur, Abdel and Silva, Maria A. de

- Souza. pp. 331-339, Elsevier, (2018)
108. Ramos-Cejudo J, Wisniewski T, Marmar C, et al. Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link. *EBioMedicine*. 2018;28:21-30. doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.021
  109. Rana A, Singh S, Deshmukh R, Kumar A. Pharmacological potential of tocopherol and doxycycline against traumatic brain injury-induced cognitive/motor impairment in rats. *Brain Inj*. 2020 Jul 2;34(8):1039-1050. doi: 10.1080/02699052.2020.1772508. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32493074.
  110. Reed J, Grillakis A, Kline A, Ahmed AE, Byrnes KR. Gait analysis in a rat model of traumatic brain injury. *Behav Brain Res*. 2021;405:113210. doi:10.1016/j.bbr.2021.113210
  111. Reeves TM, Lyeth BG, Povlishock JT. Long-term potentiation deficits and excitability changes following traumatic brain injury. *Exp Brain Res*. 1995;106(2):248-256. doi:10.1007/BF00241120
  112. Ryu J, Stone P, Lee S, Payne B, Gorse K, Lafrenaye A. Buprenorphine alters microglia and astrocytes acutely following diffuse traumatic brain injury. *Sci Rep*. 2021 Apr 21;11(1):8620. doi: 10.1038/s41598-021-88030-z. PMID: 33883663; PMCID: PMC8060410.
  113. Rzechorzek NM, Thrippleton MJ, Chappell FM, Mair G, Ercole A, Cabeleira M; CENTER-TBI High Resolution ICU (HR ICU) Sub-Study Participants and Investigators; Rhodes J, Marshall I, O'Neill JS. A daily temperature rhythm in the human brain predicts survival after brain injury. *Brain*. 2022 Jun 30;145(6):2031-2048. doi: 10.1093/brain/awab466. PMID: 35691613; PMCID: PMC9336587.
  114. Sacho RH, Childs C. The significance of altered temperature after traumatic brain injury: an analysis of investigations in experimental and human studies: part 2. *Br J Neurosurg*. 2008 Aug;22(4):497-507. doi: 10.1080/02688690802245558. PMID: 18649161.
  115. Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S, Cotev S (1988) Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med* 16(3): 258–265
  116. Sharp D., Beckmann C., Greenwood R., et al. Default mode network functional and structural connectivity after traumatic brain injury. *Brain*. 2011;134(Pt 8):2233-2247. doi:10.1093/brain/awr175
  117. Shishido H, Ueno M, Sato K, Matsumura M, Toyota Y, Kirino Y, Tamiya T, Kawai N, Kishimoto Y. Traumatic Brain Injury by Weight-Drop Method Causes Transient Amyloid- $\beta$  Deposition and Acute Cognitive Deficits in Mice. *Behav Neurol*. 2019 Mar 3;2019:3248519. doi: 10.1155/2019/3248519. PMID: 30944661; PMCID: PMC6421814.

118. Silva, D. S. et al. Traumatic brain injury: clinical and pathological parameters in an experimental weightdrop model. *Acta Cirúrgica Brasileira* [online]. 2011, v. 26, n. 2, pp. 94-100. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000200004>.
119. Stelfa G, Svalbe B, Vavers E, Durtis I, Dambrova M, Zvejniece L. Moderate traumatic brain injury triggers long-term risks for the development of peripheral pain sensitivity and depressive-like behavior in mice. *Front Neurol*. 2022 Sep 20;13:985895. doi: 10.3389/fneur.2022.985895. PMID: 36203982; PMCID: PMC9531915.
120. Stocchetti N, Carbonara M, Citerio G, et al. Severe traumatic brain injury: targeted management in the intensive care unit. *Lancet Neurol*. 2017;16(6):452-464. doi:10.1016/S1474-4422(17)30118-7
121. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181-1194. doi:10.1007/s12035-014-9070-5
122. Tefertiller C, Hays K, Natale A, et al. Results From a Randomized Controlled Trial to Address Balance Deficits After Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2019;100(8):1409-1416. doi:10.1016/j.apmr.2019.03.015
123. Tehse J, Taghibiglou C. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *Eur J Neurosci*. 2019;49(9):1157-1170. doi:10.1111/ejn.14307
124. Thompson HJ, Tkacs NC, Saatman KE, Raghupathi R, McIntosh TK. Hyperthermia following traumatic brain injury: a critical evaluation. *Neurobiol Dis*. 2003;12(3):163-173. doi:10.1016/s0969-9961(02)00030-x
125. Titus DJ, Oliva AA, Wilson NM, Atkins CM. Phosphodiesterase inhibitors as therapeutics for traumatic brain injury. *Curr Pharm Des*. 2015;21(3):332-342. doi:10.2174/1381612820666140826113731
126. Vakil E, Greenstein Y, Weiss I, Shtein S. The Effects of Moderate-to-Severe Traumatic Brain Injury on Episodic Memory: a Meta-Analysis. *Neuropsychol Rev*. 2019;29(3):270-287. doi:10.1007/s11065-019-09413-8
127. van Veelen MJ, Brodmann Maeder M. Hypothermia in Trauma. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(16):8719. Published 2021 Aug 18. doi:10.3390/ijerph18168719
128. van Vliet EA, Nnode-Ekane XE, Lehto LJ, et al. Long-lasting blood-

- brain barrier dysfunction and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2020;145:105080. doi:10.1016/j.nbd.2020.105080
129. Vella MA, Crandall ML, Patel MB. Acute Management of Traumatic Brain Injury. *Surg Clin North Am.* 2017 Oct;97(5):1015-1030. doi: 10.1016/j.suc.2017.06.003. PMID: 28958355; PMCID: PMC5747306.
130. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2022;11(1):3. Published 2022 Jan 25. doi:10.1186/s40035-021-00278-7
131. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, et al. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology.* 2010;75(20):1786-1793. doi:10.1212/WNL.0b013e3181fd62d2
132. Wang HC, Lin YJ, Shih FY, Chang HW, Su YJ, Cheng BC, Su CM, Tsai NW, Chang YT, Kwan AL, Lu CH. The Role of Serial Oxidative Stress Levels in Acute Traumatic Brain Injury and as Predictors of Outcome. *World Neurosurg.* 2016 Mar;87:463-70. doi: 10.1016/j.wneu.2015.10.010. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26481337.
133. Wang J, Swanson RA. Superoxide and Non-ionotropic Signaling in Neuronal Excitotoxicity. *Front Neurosci.* 2020;4:861. Published 2020 Sep 3. doi:10.3389/fnins.2020.00861
134. Wang KK, Yang Z, Zhu T, et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(2):165-180. doi:10.1080/14737159.2018.1428089
135. Warburton EC, Brown MW. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res.* 2015;285:131-139. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050
136. Wasserman J, McGuire LS, Sick T, Bramlett HM, Dietrich WD. An Exploratory Report on Electrographic Changes in the Cerebral Cortex Following Mild Traumatic Brain Injury with Hyperthermia in the Rat. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2021;11(1):10-18. doi:10.1089/ther.2020.0002
137. Williams, N. S., O'Connell, P. R., & McCaskie, A. (Eds.). (2018). *Bailey & Love's short practice of surgery.* CRC press.
138. Witcher KG, Bray CE, Chunchai T, et al. Traumatic Brain Injury Causes Chronic Cortical Inflammation and Neuronal Dysfunction Mediated by Microglia. *J Neurosci.* 2021;41(7):1597-1616. doi:10.1523/JNEUROSCI.2469-20.2020
139. Xu XJ, Yang MS, Zhang B, Niu F, Dong JQ, Liu BY. Glucose metabolism: A link between traumatic brain injury and Alzheimer's disease. *Chin J Traumatol.* 2021;24(1):5-10. doi:10.1016/j.cjtee.2020.10.001

140. Yang T, Kong B, Gu JW, Kuang YQ, Cheng L, Yang WT, Xia X, Shu HF. Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Aug;34(6):797-804. doi: 10.1007/s10571-014-0070-9. Epub 2014 May 21. PMID: 24846663.
141. Yildirim E, Ozisik K, Solaroglu I, Kaptanoglu E, Beskonakli E, Sargon MF, Kilinc K, Sakinci U. Protective effect of erythropoietin on type II pneumocyte cells after traumatic brain injury in rats. *J Trauma*. 2005 Jun;58(6):1252-8. doi: 10.1097/01.ta.0000169803.09482.f8. PMID: 15995478.
142. Yuan M, Wu H. Astrocytes in the Traumatic Brain Injury: the Good and the Bad. *Exp Neurol*. 2022; 348:113943. doi:10.1016/j.expneurol.2021.113943
143. Zhang F, Dong H, Lv T, Jin K, Jin Y, Zhang X, Jiang J. Moderate hypothermia inhibits microglial activation after traumatic brain injury by modulating autophagy/apoptosis and the MyD88-dependent TLR4 signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 2018 Sep 20;15(1):273. doi: 10.1186/s12974-018-1315-1. PMID: 30236124; PMCID: PMC6146525.
144. Zhou Y, Shao A, Yao Y, Tu S, Deng Y, Zhang J. Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):62. Published 2020 Apr 15. doi:10.1186/s12964-020-00549-2
145. Zoltewicz JS, Mondello S, Yang B, et al. Biomarkers track damage after graded injury severity in a rat model of penetrating brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(13):1161-1169. doi:10.1089/neu.2012.2762