

José Alejandro Ribeiro dos Santos

**CANAIS IÓNICOS MECANO-SENSÍVEIS
E STRESSE OXIDATIVO NO
TRAUMATISMO CRÂNIO-ENCEFÁLICO**

U. PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Porto 2005



José Alejandro Ribeiro dos Santos

**CANAIS IÓNICOS MECANO-SENSÍVEIS
E STRESSE OXIDATIVO NO
TRAUMATISMO CRÂNIO-ENCEFÁLICO**

U. PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Porto 2005

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.

Orientador: Professor Doutor Nuno Pedro Garcia Fernandes Bento Borges (Professor Associado da Faculdade de Ciências da Nutrição da Universidade do Porto).

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo (Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).

O candidato realizou o trabalho experimental com o apoio de uma bolsa de Doutoramento atribuída pela Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (PRAXIS XXI/BD/21338/99).



Índice

Agradecimentos.....	5
Resumo	11
Summary	15
Abreviaturas	17
Introdução	19
Modelo de lesão cerebral difusa no Rato.....	20
Lesão primária, lesão secundária e lesão axonal difusa.....	21
Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	22
Canais iónicos mecano-sensíveis.....	23
Estudo morfológico	24
Stresse oxidativo no TCE.....	25
Defesas antioxidantes no cérebro.....	26
Peroxidação lipídica no TCE.....	28
Défices motores e cognitivos pós-TCE	28
Objectivo do trabalho	29
Métodos	31
Modelo experimental de lesão cerebral difusa no Rato	31
Estudo das acções de alguns fármacos em ratos submetidos ao modelo de traumatismo crânio encefálico	32
Tratamento com gadolínio	32
Tratamento com amilorido -	33
Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	33
Estudo morfológico	34

Determinação da actividade da catálase	35
Determinação da actividade da peroxidase da glutathione	37
Determinação da actividade da dismutase do superóxido	38
Determinação das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral.	38
Determinação de hidroperóxidos lipídicos	39
Testes de avaliação de défice neurológico	39
Teste de sensibilidade posicional	39
Teste de correcção da postura (<i>righting test</i>).....	40
Teste da tonicidade muscular	40
Testes vestibulomotores	40
Análise estatística dos resultados.....	41
Fármacos e outras substâncias utilizados	41
Resultados	43
Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	43
Estudo morfológico	44
Resultados das avaliações morfométricas.....	44
Actividade da catálase cerebral	47
Animais não perfundidos com soro fisiológico	47
Animais perfundidos com soro fisiológico	48
Actividade da catálase hepática.....	49
Actividade da catálase eritrocitária	50
Actividade da peroxidase da glutathione cerebral	51
Actividade da peroxidase da glutathione hepática.....	51
Actividade da peroxidase da glutathione no sangue.....	52

Actividade da dismutase do superóxido cerebral.....	52
Actividade da dismutase do superóxido hepática	53
Actividade da dismutase do superóxido no sangue	54
Avaliação da peroxidação lipídica.....	55
Determinação das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral.	55
Determinação de hidroperóxidos lipídicos	56
Testes de avaliação de défice neurológico	57
Discussão.....	59
Cálcio intracelular e lesão neuronal	59
Canais iónicos mecano-sensíveis no TCE.....	61
Bloqueadores dos canais iónicos mecano-sensíveis no TCE.....	62
Coloração do tecido cerebral pelo TTC	64
A mitocôndria no TCE.....	67
Perturbações do transporte axonal e acumulação de organelos no TCE.....	71
Stresse oxidativo no TCE.....	73
Peroxidação lipídica no TCE.....	80
Testes de avaliação de défice neurológico	83
Os anestésicos como neuroprotectores.....	84
Conclusões	85
Bibliografia.....	87



Agradecimentos

A elaboração do texto que serve de base a uma dissertação de doutoramento permite uma perspectiva muito peculiar sobre todo este processo. Uma das primeiras constatações é a de que um grande número de pessoas possibilitou directa ou indirectamente a realização de todo este trabalho. Reconhecer e agradecer adequadamente a intervenção daqueles que me ajudaram, é para mim, uma tarefa na qual provavelmente pecarei por defeito.

No final do 4º ano da minha licenciatura em Ciências da Nutrição foi-me proposto pelo Professor Doutor Nuno Borges a realização do estágio curricular, sob a sua orientação, na Unidade de Farmacologia Clínica, do Instituto de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina do Porto (IFTFMUP). Neste período tive a oportunidade de contactar pela primeira vez com a realidade da investigação científica básica e clínica, o que despertou em mim um grande interesse por esta área. No final da licenciatura permaneci nesta instituição como bolseiro de investigação científica, desenvolvendo trabalho na área da hipertensão arterial e nutrição. Este período contou com a orientação e apoio do Professor Doutor Jorge Polónia a quem agradeço todas as oportunidades que me proporcionou.

Já com uma bolsa de doutoramento da FCT aprovada na área da hipertensão arterial, não foi possível prosseguir essa linha de trabalho. Surge então a oportunidade de iniciar o percurso que levou a esta dissertação num campo que me era totalmente estranho. Esta viragem de 180º no rumo do trabalho implicou dificuldades acrescidas e um período de aprendizagem longo. No entanto, constituiu um desafio muito interessante. Esta oportunidade foi-me generosamente proporcionada pelo grupo liderado pela Professora Doutora

Agradecimentos

Isabel Azevedo e de que fazem parte os Professores Doutores António Sarmiento e Nuno Borges.

Quero começar por prestar o meu reconhecimento ao meu orientador Professor Doutor Nuno Borges. O apoio, confiança e amizade com que me brindou, assim como a sua abertura e sabedoria, permitiram uma orientação sem imposições, rica em sugestões úteis, que em muito contribuíram para o que de bom tem este trabalho. Muito obrigado por este agradável percurso de longos anos!

Na pessoa da Professora Doutora Isabel Azevedo, minha co-orientadora e Directora do Serviço e Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto, encontrei um modelo de conhecimento, ponderação, sensatez, humildade e gosto pela ciência. Agradeço-lhe a confiança e entusiasmo que me incutiu, as sempre pertinentes sugestões e as muitas horas de trabalho que gentilmente me deu. Num contexto económico difícil para a investigação no serviço que dirige, agradeço-lhe ter disponibilizado incondicionalmente a maior parte dos meios que tornaram possível esta dissertação.

Ao Professor Doutor António Sarmiento agradeço o exemplo de dedicação ao próximo, ao trabalho e à ciência. A sua honestidade, disponibilidade total, amizade sincera e incondicional constituem para mim uma referência e sinal de esperança num mundo melhor.

O trabalho experimental apresentado nesta dissertação de doutoramento foi desenvolvido no Instituto de Farmacologia e Terapêutica e no Serviço e Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto.

Agradeço ao Professor Doutor Serafim Guimarães por me ter acolhido no prestigiado IFTFMUP desde o estágio curricular até ao doutoramento.

Ao Professor Doutor Patrício Soares da Silva, actual director do IFTFMUP, queria mostrar o meu reconhecimento por todo esforço que dedica à investigação científica nacional. O apoio que me prestou, disponibilizando meios e equipamentos sempre que o solicitei, foi essencial ao desenrolar deste trabalho.

Aos Doutores Pedro Gomes e Rui Pedrosa, expresso aqui a minha gratidão pelo companheirismo, amizade e pelas horas passadas no Fluoromax!

Ao Dr. António Cerejo o meu reconhecimento pelas técnicas cirúrgicas que me ensinou e sobretudo pelo convívio e simpatia.

À Professora Doutora Maria Augusta Viera Coelho e ao Dr. Eduardo Moura os meus agradecimentos pela simpatia, amizade e sobretudo pelas horas de trabalho que me dedicaram.

Ao Professor Doutor Hipólito Reis, o meu obrigado pelo apoio paciente e pelos ensinamentos que me transmitiu.

Ao Professor Doutor Manuel Nuno Alçada nada poderá retribuir as inúmeras horas de assistência informática. Contudo o que mais valorizo é a boa disposição e amizade com que tive a honra de ser distinguido.

À Professora Conceição Calhau, o meu obrigado pelos ensinamentos com as culturas de células e pelo estímulo constante à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria João Martins e à Dra. Ana Mota agradeço as muitas horas de trabalho com a fosfátase alcalina e mais ainda a simpatia com que me brindaram.

À Professora Doutora Maria de Fátima Martel a minha gratidão pelo apoio através dos seus projectos e pela confiança que em mim depositou.

Agradecimentos

À Engenheira Paula Serrão, obrigado pela simpatia e pelo excelente desempenho na arte de manter o laboratório a trabalhar!

Aos Professores Doutores António Albino Teixeira, Daniel Moura, Manuel Vaz da Silva e José Pedro Nunes o meu reconhecimento pelas longas conversas, disponibilidade e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Félix Carvalho da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a minha sincera gratidão pela sua simpatia e pelo tempo que me disponibilizou para a aprendizagem de algumas das técnicas de base usadas nesta dissertação.

À Professora Doutora Maria Daniel Vaz de Almeida, Presidente dos Conselhos Directivo e Científico da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (FCNAUP), quero expressar o meu agradecimento pelo contínuo estímulo e apoio à formação pós-graduada dos docentes da faculdade que dirige. O apoio do pessoal docente e não docente da FCNAUP foi por mim sentido como um forte estímulo, pelo qual não posso deixar de mostrar a minha gratidão. Em particular à Sra. Dra. Meibel Baptista o meu obrigado por todo o apoio e simpatia com que tive a honra de ser distinguido.

Ao Mestre Bruno Oliveira a minha gratidão pelo apoio estatístico na análise dos testes de défices motores e cognitivos pós-TCE.

Não posso esquecer o companheirismo e simpatia com que me distinguiram as Professoras Doutoradas Raquel Soares e Manuela Morato, as Dras. Elisa Keating, Sofia Magina, Rita Negrão, Sónia Fraga, Clara Lemos, Maria João Pinho, Rosário Monteiro, Elisabete Silva, Joana Santos e o Dr. Fernando Magro.

À Dra. Sandra Ribeiro e ao Laboratório de Bioquímica do Hospital de S. João a minha gratidão pelas muitas horas de trabalho no COBAS MIRA PLUS.

À Sra. D. Luísa Vasques a minha gratidão pelas muitas horas de preparação de amostras para microscopia electrónica, mas sobretudo pela amizade que muito prezo.

À Sra. D. Conceição Martins, a minha gratidão pelo excelente trabalho de manutenção dos animais, pela ajuda nas experiências e pela simpatia.

Às Senhoras D. Gilda Romariz, D. Mabilde Gomes e D. Teresa Pereira a minha gratidão pela competente manutenção do laboratório, do biotério, e acima de tudo por ajudarem a criar um bom ambiente de trabalho.

À Sra. D. Aida Santos, D. Fernanda Melo Adrião e D. Fátima Maio obrigado pelo apoio burocrático e sobretudo pela boa disposição que me transmitiam!

Aos meus pais, à Cláudia e à Catarina, dedico esta dissertação como só um filho, marido e pai eternamente grato o pode fazer.

Alguns dos resultados apresentados e discutidos nesta dissertação fazem parte das seguintes publicações:

- Santos A, Borges N, Cerejo A, Sarmiento A. Brain catalase activity in a model of closed head trauma in the rat: Effect of gadolinium and amiloride. *British Journal of Pharmacology* (2002) 137: 136.
- Santos A, Borges N, Sarmiento A, Azevedo I. Effect of gadopentetate dimeglumine or amiloride on brain mitochondrial diameter after experimental brain trauma. *The FASEB Journal* (2004) 18(4): A212.
- Borges N, Cerejo A, Santos A, Sarmiento A, Azevedo I. Changes in rat cerebral mitochondrial succinate dehydrogenase activity after brain trauma. *Intern. J. Neuroscience* (2004) 114:217-227.
- Santos A, Borges N, Cerejo A, Sarmiento A, Azevedo I. Catalase Activity and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Production in a Rat Model of Diffuse Axonal Injury. Effect of Gadolinium and Amiloride. *Neurochemical Research* (2005) 30(5): 625-621.



Resumo

As lesões traumáticas constituem a principal causa de morte nos indivíduos entre 1 e 44 anos de idade, estando a lesão cerebral envolvida em 50 % das mortes após o traumatismo. Os modelos experimentais de traumatismo crânio-encefálico (TCE) desempenham um importante papel na avaliação e compreensão das complexas alterações fisiológicas, comportamentais e histopatológicas associadas a esta forma de traumatismo. O trabalho realizado no âmbito desta dissertação tem por base um modelo experimental de TCE desenvolvido por Marmarou e colaboradores. Este é um modelo de TCE fechado, uma vez que o crânio é protegido de forma a evitar a sua fractura; desta forma podem ser infligidos níveis elevados de impacto e aceleração, resultando em lesão cerebral difusa. O termo "lesão primária" traduz os danos mecânicos sofridos pelo sistema nervoso central (SNC) no momento do impacto; estes danos não são reversíveis e por isso não são passíveis de tratamento. Por outro lado, a "lesão secundária" ou "lesão diferida" constitui um processo potencialmente reversível iniciado no momento da agressão traumática, surgindo os sinais clínicos numa janela temporal de algumas horas a dias após o TCE e progredindo durante dias ou meses. Após o TCE, a perturbação do equilíbrio iónico intracelular será o principal desencadeador de todo um conjunto de cascatas metabólicas que levam à lesão secundária. Assim, o controlo desta fase crítica pelo bloqueio de canais iónicos após o trauma poderá de alguma forma minimizar a lesão secundária ao traumatismo. É actualmente consensual a importância que a regulação do cálcio intracelular tem nos processos fisiopatológicos da lesão neuronal. Apesar da lesão celular

poder ocorrer sem perda da homeostasia do Ca^{2+} , muitos dos processos chave dessa lesão, passíveis de intervenção fármaco-terapêutica, envolvem este ião. Dados recentes sugerem que a deformação traumática dos axónios é responsável por um influxo anormal de sódio e cálcio através de canais mecano-sensíveis. Existindo evidência prévia do nosso grupo, no mesmo modelo de TCE, sobre o papel protector dos bloqueadores dos canais iónicos mecano-sensíveis no desenvolvimento do edema cerebral pós-TCE, foi decidido verificar no trabalho que levou a esta dissertação a eventual existência de efeitos neuroprotectores do gadolínio e do amilorido após o TCE em vários parâmetros: alterações do metabolismo mitocondrial pela técnica de coloração pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio; alterações ultra-estruturais em zonas com predomínio de feixes axonais (cíngulo) no sentido de controlar perturbações sobre alguns parâmetros da lesão axonal difusa, nomeadamente acumulação de organelos e edema mitocondrial; modificações na actividade de enzimas antioxidantes a nível do sistema nervoso central e a nível sistémico associadas ao stresse oxidativo pós-trauma; determinação da peroxidação lipídica a nível cerebral; desempenho em testes de défice neurológico.

Os nossos resultados mostram que a administração de bloqueadores dos canais iónicos mecanosensíveis após o TCE evita as modificações axonais responsáveis pela alteração da coloração pelo TTC, preservam o diâmetro mitocondrial, reduzem a acumulação de peroxissomas nos axónios, podem reduzir a hiperemia, preservam a actividade da catálase cerebral e hepática, preservam a actividade da dismutase do superóxido sanguínea e hepática (neste último caso só com o GAD), diminuem a peroxidação lipídica, mantêm a

tonicidade muscular e no caso do amilorido preservam a actividade motora no teste do *rotarod*.

Todos estes dados sugerem que os canais iónicos mecanosensíveis têm um papel de relevo na origem da perturbação iónica que leva ao stresse oxidativo e a outros processos de lesão secundária após o TCE. Se todas as alterações observadas com a administração destes fármacos representarem de facto efeitos benéficos no TCE, os nossos dados mostram que esta intervenção farmacológica poderá ser eficaz numa janela temporal de pelo menos trinta minutos após o traumatismo.



Summary



Traumatic injuries are the leading cause of mortality in individuals aged 1 to 44 years, and brain injury significantly contributes to the outcome in nearly one-half of all deaths from trauma. Experimental models of traumatic brain injury (TBI) play an important role in the evaluation and understanding of the complex physiological, behavioural and histopathological changes associated to this form of trauma. Our work is based in the closed head trauma model developed by Marmarou and co-workers capable of producing diffuse brain injury without focal lesions. Primary injury is related to the mechanical damage suffered by the central nervous system immediately upon impact; this is an irreversible, non treatable damage. On the other hand, secondary injury or delayed onset injury is a potentially reversible process initiated the moment traumatic injury is inflicted; the clinical signs of this situation emerge in a few hours or days after TBI progressing for days or months. After TBI, intracellular ionic imbalance is the main trigger of several metabolic cascades leading to secondary injury. Therefore, controlling this critical phase after trauma with the use of ion channel blockers may help minimize secondary injury. The importance of intracellular calcium regulation in the pathophysiological processes of neuronal lesion is a well established fact. Although cellular lesion can occur without the loss of calcium homeostasis, many key events of that lesion, where pharmacological intervention is feasible, involve that ion. Recent data suggests that traumatic deformation of axons is responsible for an abnormal sodium and calcium influx through mechanogated ion channels. Using the same trauma model, previous data from our group showed that mechanogated ion channel blockers

Summary

prevented the development of brain oedema after TBI. In this work we studied the possibility of additional neuroprotective effects of gadolinium and amiloride through the evaluation of several other parameters: staining brain tissue with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to evaluate changes in mitochondrial metabolism; ultrastructural changes in white matter linked with diffuse axonal injury, namely organelle accumulation and mitochondrial swelling; peripheral and central nervous system modification in antioxidant enzymes activity associated with post-trauma oxidative stress; evaluation of lipid peroxidation in brain tissue; evaluation of neurological deficit tests performance.

Our results show that mechanogated ion channel blockers administration thirty minutes after TBI prevented the axonal changes linked to TTC staining, maintained mitochondrial mean diameter, prevented peroxisome accumulation in axons, prevented hyperaemia, maintained hepatic and brain catalase activity, maintained blood and hepatic superoxide dismutase activity, reduced lipid peroxidation, maintained muscle tone and motor activity loss in the rotarod test was avoided by amiloride administration.

Our results suggest that mechanogated ion channels play an important role in the loss of ion homeostasis leading to oxidative stress and to other processes of secondary injury after TBI.

In the event that all the observed changes after the administration of these drugs represent true beneficial effects in TBI treatment, our data shows that this pharmacological intervention would be effective in a thirty minute time window after TBI.

Abreviaturas

AMI – amilorido.

CONT – grupo controlo sem tratamento.

CONTAMI – grupo controlo tratado com amilorido.

CONTGAD – grupo controlo tratado com gadopentetato dimeglumina.

GAD – gadopentetato dimeglumina.

Gd-DOTA – *gadolinium-tetraazacyclododecanetetraacetic acid*; ácido gadotérico.

L-DOPA – *3,4-dihydroxy-L-phenylalanine*; 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina.

NMDA – N-metil-D-aspartato.

SNC – sistema nervoso central.

TBARS – *thiobarbituric acid reactive substances*; Substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico.

TTC – cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

TCE – traumatismo crânio encefálico; grupo com traumatismo crânio encefálico não tratado.

TCEAMI – grupo com traumatismo crânio encefálico tratado com amilorido.

TCEGAD – grupo com traumatismo crânio encefálico não tratado.

Introdução

Dados epidemiológicos obtidos na América do Norte mostram que as lesões traumáticas constituem a principal causa de morte nos indivíduos entre 1 e 44 anos de idade, estando a lesão cerebral envolvida em 50 % das mortes após o traumatismo. Cerca de um terço dos sujeitos hospitalizados por traumatismo crânio-encefálico (TCE) ficarão com algum tipo de incapacidade e desses cerca de 20 % terão incapacidades graves (1, 2). Nos Estados Unidos da América, Austrália, França e Espanha a mortalidade por TCE varia entre 20 a 30 casos por 100.000 habitantes. No Reino Unido esse valor é dois terços mais baixo, com 7 casos por 100.000 habitantes (3, 4). Em Portugal, a incidência geral da mortalidade para todo o país terá sido em 1997 de 17 casos por 100.000 habitantes. No entanto, a incidência por grupos etários será muito diversa, 20 casos por 100.000 habitantes entre os 20 e os 29 anos e muito superior, 54 casos por 100.000 habitantes, nos indivíduos com 80 ou mais anos. A percentagem de mulheres é muito inferior à dos homens representando, nos anos analisados (1994, 1996 e 1997), 36 % do total de internamentos e 22 % dos casos de morte. Assim, em Portugal poderemos ter, anualmente, mais de 3.700 novos casos de pessoas com incapacidade resultante de TCE e, dessas, cerca de 750 ficarão com incapacidade grave (5). Actualmente não existem intervenções farmacológicas eficazes para este sério problema de saúde pública, estando os principais esforços terapêuticos centrados em medidas de suporte (6).

Modelo de lesão cerebral difusa no Rato

Os modelos experimentais de TCE desempenham um importante papel na avaliação e compreensão das complexas alterações fisiológicas, comportamentais e histopatológicas associadas a esta forma de traumatismo. No sentido de tornar possível o esclarecimento deste conjunto de alterações, os actuais modelos experimentais de TCE foram desenvolvidos de forma a mimetizar as manifestações clínicas do TCE humano. Contudo, uma vez que o TCE, no Homem, envolve uma patologia muito heterogénea, não existe nenhum modelo animal capaz de reproduzir o completo espectro de sequelas observado nestes doentes. Nas últimas décadas o intenso trabalho experimental desenvolvido, com recurso a estes modelos, contribuiu de forma decisiva para o conhecimento das sequelas do TCE. A compreensão destes processos permitiu o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e tratamento que já fazem parte da prática clínica diária ou se encontram em fases distintas de ensaio pré-clínico ou clínico.

Os modelos de TCE em roedores são utilizados na grande maioria dos estudos; as vantagens mais evidentes são o pequeno tamanho destes animais, custo moderado, quadro normativo definido e a grande quantidade de informação pré-existente (7-9).

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação tem por base um modelo experimental de TCE desenvolvido por Marmarou e colaboradores. Este é um modelo de TCE fechado, uma vez que o crânio é protegido de forma a evitar a sua fractura; desta forma podem ser infligidos níveis elevados de impacto e aceleração, resultando em lesão cerebral difusa. Este terá sido o primeiro modelo desenvolvido capaz de induzir lesão axonal generalizada no Rato (10,

11). A lesão axonal difusa foi classificada no Homem, por Adams e colaboradores, em três graus: o grau 1 caracteriza-se pela presença de evidência histológica de lesão axonal na massa branca dos hemisférios cerebrais, corpo caloso, tronco cerebral e menos frequentemente no cerebelo; o grau 2 associa-se à presença de lesão focal no corpo caloso; e o grau 3 caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão focal adicional nos quadrantes dorsolaterais do lado frontal do tronco cerebral (12). No modelo de Marmarou, os animais com lesão grave apresentam lesão axonal difusa de grau 3 com alterações axonais generalizadas envolvendo o cerebelo e o tronco cerebral com hemorragias petequiais; este modelo económico e simples produz uma lesão axonal difusa similar à que foi descrita no Homem (11).

Lesão primária, lesão secundária e lesão axonal difusa

O termo “lesão primária” traduz os danos mecânicos sofridos pelo sistema nervoso central (SNC) no momento do impacto; estes danos não são reversíveis e por isso não são passíveis de tratamento. Por outro lado, a “lesão secundária” ou “lesão diferida” constitui um processo potencialmente reversível iniciado no momento da agressão traumática, surgindo os sinais clínicos numa janela temporal de algumas horas a dias após o TCE e progredindo durante dias ou meses (13). A lesão secundária do SNC é uma complexa e pouco compreendida rede de alterações interligadas a nível funcional, estrutural, celular e molecular. A lesão traumática do sistema nervoso central é encarada como o passo inicial de uma série de eventos bioquímicos e fisiopatológicos que podem ter como consequência danos teciduais irreversíveis. Entre os vários factores envolvidos neste processo de “lesão secundária” destacam-se: alterações do equilíbrio iónico, libertação de aminoácidos excitatórios, edema

cerebral, quebra da barreira hemo-encefálica, formação de espécies reactivas de oxigénio e perturbação do metabolismo energético (14-16).

A designação “lesão axonal difusa” foi introduzida por Adams em 1982. Esta lesão resulta das deformações mecânicas sofridas pelo sistema nervoso central quando do traumatismo, fundamentalmente por forças de estiramento produzidas por aceleração angular ou rotação (17). O grau de lesão axonal é directamente proporcional ao grau de deformação mecânica e consequente desequilíbrio iónico intracelular, desencadeando por si só muitas das reacções acima descritas (18, 19). A lesão axonal difusa é considerada como a neuropatologia mais frequentemente associada ao TCE (20) e é também a principal causa de sequelas de foro neurológico na ausência de lesões intracranianas detectáveis pelos métodos imagiológicos habituais (21).

Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

O composto cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) tem sido frequentemente utilizado na investigação biomédica em modelos de isquemia cerebral, miocárdica, hepática, músculo-esquelética e renal. O TTC sofre redução por acção de enzimas mitocondriais como a desidrogénase do succinato, formando-se no processo um composto de cor vermelha (formazano). Os tecidos em que há respiração mitocondrial coram de vermelho, enquanto que tecidos em que a respiração mitocondrial cessou permanecem com cor branca (22, 23). A coloração pelo TTC tem sido usada para avaliar o efeito de intervenções terapêuticas no tecido nervoso após isquemia focal experimental (24, 25); este método já foi também usado para quantificar o volume de lesão no modelo de percussão com fluido no Rato (26). A maioria dos modelos animais de TCE como o impacto cortical controlado (27), a percussão com

fluido (28) ou o modelo criogénico de lesão cerebral (29), produzem uma contusão cerebral focal que raramente se observa nas situações clínicas de lesão cerebral difusa (30, 31). Tanto quanto é do nosso conhecimento, a coloração pelo TTC nunca tinha sido aplicada no modelo de trauma usado nesta dissertação; esta técnica foi por nós usada com o intuito de avaliar alterações da actividade metabólica cerebral em animais com traumatismo cerebral fechado assim como a sua eventual reversão pelos fármacos a testar.

Canais iónicos mecano-sensíveis

A deformação traumática dos axónios é responsável pelo desencadear de influxos iónicos anormais através de vários tipos de canais. O envolvimento dos canais iónicos mecano-sensíveis neste desequilíbrio iónico é sustentado pelos dados de vários investigadores (32-35). Os canais iónicos mecano-sensíveis são aqueles cuja abertura pode ser alterada por forças mecânicas; o stresse mecânico é subsequentemente transformado numa resposta eléctrica e/ou química (36). O gadolínio (Gd^{3+}), o amilorido (AMI) e a gentamicina são considerados como bloqueadores relativamente selectivos dos canais iónicos mecano-sensíveis (37). A existência de canais iónicos mecano-sensíveis no sistema nervoso central já foi demonstrada, assim como a sua inibição pelo ião Gd^{3+} e pelo diurético amilorido (38, 39). O TCE é seguido de um influxo excessivo de cálcio para o axónio e este ião desempenha um papel central como mediador da lesão e degeneração axonais (40, 41). Uma parte importante do cálcio entra após o TCE nos axónios via canais iónicos mecano-sensíveis (39), o que nos levou a considerar o papel que a inibição destes canais poderia ter em algumas manifestações de lesão secundária ao trauma. A favor desta teoria temos a existência de dados prévios do nosso grupo que

tinham mostrado o efeito protector do gadolínio, amilorido e gentamicina na formação do edema cerebral após o TCE (42).

Estudo morfológico

A caracterização morfológica do modelo de traumatismo usado nesta dissertação foi publicada pelos seus autores em simultâneo com a descrição do modelo de TCE propriamente dito; uma das conclusões foi a de que se observou edema axonal difuso 6 horas após o TCE, atingindo a sua expressão máxima às 24 horas (10, 11).

A realização do estudo morfológico apresentado nesta dissertação foi despoletada pelos resultados das experiências com o TTC. A coloração pelo TTC de feixes axonais após o TCE (feixes esses que permaneciam incolores nos controlos) indicava a actividade de enzimas mitocondriais após o trauma onde nos controlos tal não era observável (43). O estudo morfológico foi realizado com o intuito de saber se havia acumulação de organelos nessas zonas após o TCE, explicando assim os resultados do TTC e as alterações observadas nos animais tratados com os fármacos. Escolheu-se o tempo de 24 horas após o traumatismo como ponto de análise dado o facto de se saber que nesse ponto a lesão axonal atingia a sua máxima expressão.

A sobrecarga intracelular de cálcio está associada a perturbações do metabolismo mitocondrial, com abertura do poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial; este permeabiliza a membrana mitocondrial a moléculas até 1,5 kDa o que leva à captação de água, edema mitocondrial e, por último, rotura da mitocôndria. A presença de mitocôndrias anormais/patológicas é indicadora de perturbação subcelular e está associada à libertação de citocromo *c* na área perimitocondrial. O citocromo *c* leva à

activação de caspases (proteases de cisteína activadas pelo cálcio) no axónio (44). A activação das caspases leva à desorganização estrutural e/ou dissolução do citoesqueleto intra-axonal, resultando em alterações funcionais graves que afectarão o neurónio no seu todo (45). Um dos efeitos observáveis é a acumulação de organelos nas zonas lesadas do citoesqueleto (46). O estudo morfológico permitiu observar algumas destas situações, assim como a sua reversão pelos inibidores dos canais mecano-sensíveis.

Stresse oxidativo no TCE

Todos os organismos vivos podem sofrer danos oxidativos; contudo, o tecido cerebral é particularmente sensível a este problema. Uma das razões reside no facto do cérebro consumir 20 % do O_2 gasto pelo organismo em repouso, apesar de apenas representar aproximadamente 2 % do peso corporal total de um homem adulto; isto é, uma grande quantidade de O_2 é processada numa massa tecidular relativamente pequena. Adicionalmente, muitos neurotransmissores são moléculas autooxidáveis; a dopamina, o seu precursor L-DOPA e a noradrenalina podem reagir com o O_2 formando O_2^- , H_2O_2 e quinonas/semiquinonas que podem esgotar a glutathiona ligando-se aos grupos sulfidrílo desta. Algumas áreas do tecido cerebral têm alto teor de ferro, encontrando-se este normalmente ligado a proteínas como citocromos, ferritina, aconitases, etc. Ao contrário do plasma, o fluido cefalo-raquidiano não consegue fixar o ferro; quando há lesão do tecido cerebral, este liberta rapidamente iões de ferro (e cobre) em formas capazes de catalizar a formação do radical hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio, a peroxidação lipídica e a auto oxidação de neurotransmissores (47).

Em modelos animais, após o TCE são libertados aminoácidos excitatórios que aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} pela activação de receptores/canais iónicos do N-metil-D-aspartato (NMDA) (48-51). A manutenção da homeostasia do Ca^{2+} intracelular após o TCE é fundamental para evitar desencadear cascatas bioquímicas e metabólicas potencialmente lesivas (52). O TCE activa diferentes vias celulares que resultam na produção de espécies reactivas de oxigénio e de azoto; de entre estas vias destacam-se a activação pelo Ca^{2+} de fosfolípases, da síntese do monóxido de azoto, da oxídase da xantina e o desencadear pelas células inflamatórias das reacções de Fenton e Haber-Weiss (53).

As sequelas do TCE não se limitam ao sistema nervoso central, existindo evidência em modelos animais (54), assim como em doentes com TCE (55), de stresse oxidativo sistémico após o traumatismo. Estes marcadores de stresse sistémico podem ser usados na avaliação da evolução clínica do doente e também na determinação da eficácia das intervenções terapêuticas efectuadas.

Defesas antioxidantes no cérebro

A anormal produção de radicais livres de oxigénio como os iões superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-), assim como do intermediário reduzido do O_2 que é o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), constitui um passo importante na cadeia de eventos que leva à lesão neuronal após o TCE (56). A principal defesa antioxidante enzimática contra os radicais O_2^- é a dismútase do superóxido (esta converte o ião O_2^- em H_2O_2) actuando de forma concertada com a catalase e a peroxidase da glutathione que degradam o H_2O_2 (57, 58). Todas as áreas do cérebro contêm dismútases do superóxido (contendo CuZn ou Mn) e peroxidase da glutathione. A importância da dismútase do superóxido é revelada

por experiências em que o aumento da expressão da enzima se traduz em aumento da longevidade de linhas celulares e atraso na apoptose neuronal induzida pela remoção de factores de crescimento do meio de cultura; pelo contrário, a inibição desta enzima provoca apoptose. A inibição da peroxidase da glutathione aumenta a morte neuronal (47).

As defesas antioxidantes do tecido cerebral são globalmente modestas. Em particular, os níveis de catalase são baixos na maior parte das regiões cerebrais (47). No Homem a actividade da catalase cerebral constitui cerca de 10 % da que se observa a nível hepático (59).

O inibidor da catalase 3-aminotriazol só inibe esta enzima na presença de H_2O_2 . A actividade da catalase cerebral de Rato e de Ratinho é rapidamente inibida quando se administra 3-aminotriazol a estes animais, o que demonstra que o cérebro gera H_2O_2 *in vivo* e que pelo menos parte deste é metabolizado pela catalase (60). A actividade desta enzima é “controlada” pela difusão do H_2O_2 a partir do citosol, uma vez que a localização subcelular da catalase ocorre fundamentalmente ao nível dos peroxissomas. Esta enzima é muito eficiente na depuração de grandes concentrações de H_2O_2 apesar da actividade específica da catalase cerebral ser menor do que a detectada a nível hepático e renal (61). A apoiar a importância da catalase na degradação do H_2O_2 a nível cerebral está o facto de a expressão desta enzima já ter sido demonstrada em todos os tipos de linhas celulares cerebrais *in vitro* (62) e *in vivo* (63, 64). A catalase parece-nos ser então um bom marcador de stresse oxidativo em situações como o TCE, em que há aumento da produção de H_2O_2 .

Peroxidação lipídica no TCE

A peroxidação lipídica induzida pelo TCE é um dos principais factores responsáveis pelos danos teciduais provocados por esta forma de traumatismo. O surgimento de fenómenos de peroxidação lipídica após o TCE tem sido amplamente descrito tanto no Homem como em modelos experimentais. Um dos mecanismos propostos para o desencadear da peroxidação lipídica após o traumatismo resulta da libertação de aminoácidos excitatórios, activação de receptores NMDA, aumento excessivo da concentração de Ca^{2+} intracelular e consequente activação de fosfolípases destruindo fosfolípidos de membrana, formando-se no processo espécies reactivas de oxigénio (65-69).

O elevado conteúdo no tecido cerebral de ácidos gordos com cadeias altamente polinsaturadas como o ácido eicosapentaenóico ($\text{C}_{20:5}$) e docosahexaenóico ($\text{C}_{22:6}$) nos lípidos de membrana dos neurónios, associado à libertação de iões ferro (e cobre) no TCE, favorecem a peroxidação lipídica (47).

A peroxidação lipídica no cérebro leva à produção de substâncias biologicamente activas (por ex: isoprostanos). A extensão deste fenómeno é tal que a capacidade de controlar a peroxidação lipídica e minimizar os efeitos biológicos dos seus subprodutos parece ser uma importante via para o tratamento do TCE (70). A determinação das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido usada como marcador de peroxidação lipídica em homogeneizados de cérebro de Rato (71).

Défices motores e cognitivos pós-TCE

A função motora é mediada por um complexo sistema de redes neuronais com origem no córtex e término no músculo esquelético. O conjunto do córtex,

córtex sensoriomotor, núcleos subcorticais, cerebelo e tronco cerebral comunicam entre si de forma a enviar sinais pela medula espinal que coordenam o movimento (72). Pensa-se que os défices motores induzidos pela lesão cerebral sejam o resultado de perturbações em qualquer ponto destas vias, sendo o objectivo de qualquer teste comportamental correlacionar os défices observados com a gravidade da lesão infligida. Os défices causados pelo TCE resultam da perturbação de vias motoras complexas e da integração sensoriomotora (73), sendo que por essa razão os testes usados nesta dissertação são testes sensoriomotores por natureza. A presença deste tipo de défices em modelos de TCE de impacto e aceleração está bem documentada (73-76).

Objectivo do trabalho

Após o TCE, a perturbação do equilíbrio iónico intracelular será o principal desencadeador de todo um conjunto de cascatas metabólicas que levam à lesão secundária. Assim, o controlo desta fase crítica pelo bloqueio de canais iónicos após o trauma poderá de alguma forma minimizar a lesão secundária ao traumatismo.

Existindo evidência prévia do nosso grupo, no mesmo modelo de TCE, sobre o papel protector dos bloqueadores dos canais iónicos mecano-sensíveis no desenvolvimento do edema cerebral pós-TCE, foi decidido verificar no trabalho que levou a esta dissertação a eventual existência de efeitos neuroprotectores do gadolínio e do amilorido após o TCE nos seguintes parâmetros:

- alterações do metabolismo mitocondrial pela técnica de coloração pelo TTC.

- alterações ultra estruturais em zonas com predomínio de feixes axonais (cíngulo) no sentido de controlar perturbações sobre alguns parâmetros da lesão axonal difusa, nomeadamente acumulação de organelos e edema mitocondrial.
- modificações na actividade de enzimas antioxidantes a nível do sistema nervoso central e a nível sistémico associadas ao stresse oxidativo pós-trauma. Determinação da peroxidação lipídica a nível cerebral.
- desempenho em testes de défice neurológico.

Métodos

Modelo experimental de lesão cerebral difusa no Rato

O trabalho foi realizado em ratos Wistar-Hannover (Harlan Ibérica, Barcelona, Espanha), machos, com peso corporal compreendido entre 340 e 400 g. Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura (21 °C) e alternância de exposição à luz (fotoperíodos de 12 horas dia/12 horas noite) com acesso livre a água e comida. Utilizou-se a ração *Teklad Global 16% Protein Rodent Diet* (Harlan Ibérica, Barcelona, Espanha).

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo diazepam (6 mg.Kg⁻¹), cetamina (60 mg.Kg⁻¹) e sulfato de atropina (0,5 mg.Kg⁻¹) por via intraperitoneal.

O aparelho de trauma consiste numa coluna de pesos de latão (450 g) que por acção da gravidade caem livremente de encontro a um capacete metálico, fixo com acrílico dentário no vértice do crânio do rato. Para provocar um traumatismo crânio encefálico grave, o peso era largado de uma altura de 2 m através de um tubo de *plexiglas* transparente. O capacete consiste num disco de aço inoxidável com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura (ver Figura 1).

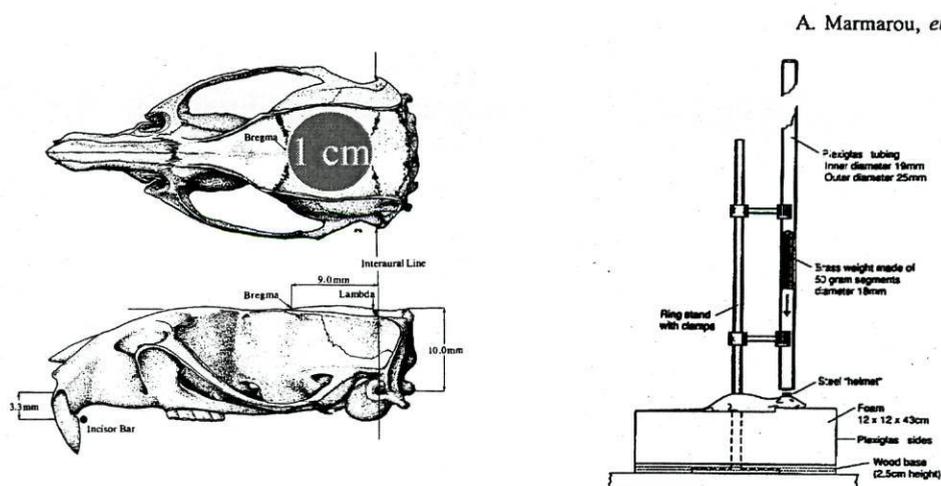


Figura 1 – esquema da colocação do capacete no crânio e do aparelho de trauma de Marmarou et al..

Após a anestesia realizava-se uma incisão na linha média da pele do crânio, sendo de seguida desinserido o periósseo que recobre o seu vértice. A área exposta era seca e entre as suturas coronal e lambdóide do crânio fixava-se o disco metálico. O animal era então colocado em pronação sobre uma esponja de constante elástica conhecida, estando esta colocada no interior de uma caixa de acrílico. A extremidade inferior do tubo de Plexiglas era então colocada directamente sobre o capacete. A lesão era provocada pela queda do peso de 2 metros de altura. Após o primeiro impacto do peso, a caixa na qual o animal estava colocado era rapidamente removida de forma a evitar um segundo impacto. Todos os animais estiveram em respiração espontânea sem entubação traqueal. Este foi o impacto definido pelos autores do modelo como capaz de provocar um traumatismo crânio encefálico grave (mortalidade de 50 %), com baixa incidência de fracturas do crânio (10, 11). Após o impacto, o rato passava de novo para a mesa cirúrgica, era atentamente observado durante alguns minutos, preparado para a administração dos fármacos quando necessário e transferido depois para nova gaiola, onde permanecia até ao fim do período de sobrevivência predeterminado.

Estudo das acções de alguns fármacos em ratos submetidos ao modelo de traumatismo crânio encefálico

Tratamento com gadolínio – trinta minutos após o trauma administrou-se gadopentetato dimeglumina (GAD) por via endovenosa (TCEGAD), na dose de 70 mg.kg⁻¹; dissolvido em cloreto de sódio 0,9%. Aos grupos com trauma não tratados (TCE) administrou-se por via endovenosa uma solução de cloreto de

sódio 0,9%. Aos grupos controlo (CONT) executou-se a preparação cirúrgica prévia ao trauma sem que este tenha sido aplicado. Aos grupos controlo tratados com gadolínio (CONTGAD) executou-se a preparação cirúrgica prévia ao trauma sem que este tenha sido aplicado, no entanto administrou-se GAD (70 mg.kg^{-1} i.v.).

Tratamento com amilorido - trinta minutos após o trauma administrou-se por via intraperitoneal amilorido (AMI) na dose de 20 mg.kg^{-1} , dissolvido numa solução 1/1 (vol/vol) de cloreto de sódio 0,9% e dimetilsulfóxido (DMSO). Aos grupos com trauma não tratados (TCE) administrou-se por via intraperitoneal uma solução 1/1 (vol/vol) de cloreto de sódio 0,9% e DMSO. Aos grupos controlo (CONT) executou-se a preparação cirúrgica prévia ao trauma sem que este tenha sido aplicado. Aos grupos controlo tratados com amilorido (CONTAMI) executou-se a preparação cirúrgica prévia ao trauma sem que este tenha sido aplicado, e administrou-se AMI (20 mg.kg^{-1}).

Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

Nos animais em que se efectuou a coloração de tecido cerebral pelo TTC após a anestesia, seguida de decapitação, o cérebro era rapidamente removido e colocado a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Logo após, era cortada uma fatia coronal com as coordenadas estereotáxicas 6,20 mm interaural/-2,80 mm bregma e 3.70 mm interaural/-5,30 bregma (com 2,5 mm de espessura) com um aparelho de corte de tecido cerebral de rato. Esta fatia era então mergulhada numa solução de TTC (2 % de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, a 37°C) durante 14 minutos; a fatia era virada aos 7 minutos de forma a permitir a completa exposição das duas faces à solução de TTC (26). Após a imersão era possível observar a coloração

vermelha típica do formazano nas duas faces das fatias, com exceção de áreas sub-corticais (cíngulo, corpo caloso, ventrículo lateral) e da cápsula interna. Obteve-se uma fotografia digital do lado rostral da fatia (6,20 mm interaural/-2,80 mm bregma) em condições de luminosidade padronizadas. As imagens obtidas foram analisadas usando um programa propositadamente desenvolvido para o efeito. Este programa permitiu determinar o nível global de intensidade da luz vermelha em cada região cerebral, assim como a percentagem de pontos de cada fatia que se apresentavam com uma coloração branca acima de um valor pré-determinado.

Estudo morfológico

Nos animais destinados ao estudo morfológico, após a anestesia foi feita uma toracotomia, inserida uma cânula na artéria aorta através do ventrículo e iniciada uma perfusão do compartimento intravascular cerebral com 500 mL de fixador de Karnovsky (1,25 % de glutaraldeído e 1 % de paraformaldeído em tampão fosfato 0,12 M, pH 7,4) (77), a uma pressão de 110 mmHg. No fim desta, foi removido o cérebro, cortada uma fatia coronal com as coordenadas estereotáxicas 6,20 mm interaural/-2,80 mm bregma e 3.70 mm interaural/-5,30 bregma (com 2,5 mm de espessura) e desta foram obtidos pequenos fragmentos do cíngulo posteriormente imersos em fixador de Karnovsky. Após esta imersão, os fragmentos do cíngulo foram lavados por 4 mudanças (a 7 minutos de intervalo) com soluções frescas do mesmo tampão adicionado de sacarose (0,6 M), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a 4°C, durante 2 horas, desidratados por passagem por soluções de etanol progressivamente mais concentradas, passados por óxido de propileno e incluídos em Epon 812 (78).

Cortes ultrafinos (600 Å a 700 Å), preparados num ultramicrotomo Ultratome III (LKB, Suécia) e corados com acetato de uranilo (2 %) e citrato de chumbo (2,6 %), foram observados num microscópio electrónico Jeol JEM 100 cxII (a 80 kV). Todas as amostras observadas foram fotografadas a uma ampliação constante (x8000) e prepararam-se provas em papel (ampliação final x24000). Realizaram-se quatro avaliações morfométricas: contagem de neurónios com e sem mitocôndrias visíveis, número de peroxissomas por fotografia e determinação do diâmetro médio das mitocôndrias. A cada fotografia foi atribuído um número de código sendo o significado deste desconhecido do observador até ao final da avaliação. O mesmo observador efectuou todas as avaliações.

Determinação da actividade da catálase

A determinação da actividade da catálase nos tecidos foi efectuada numa fase inicial em animais sem perfusão do compartimento intravascular, tendo posteriormente sido implementado este procedimento. Nos grupos com perfusão, após a anestesia foi feita uma toracotomia, inserida uma cânula na artéria aorta através do ventrículo, e iniciada uma perfusão do compartimento intravascular com 300 mL de NaCl 0,9 %, a 4 °C e a uma pressão de 110 mmHg.

Para a determinação da actividade no sangue, colheram-se amostras directamente do ventrículo esquerdo com agulha 25G para tubo heparinizado. Centrifugou-se a 1000 g durante 15 minutos. Retirou-se o plasma. Lavou-se 3 vezes com solução salina isotónica. Lisaram-se as células com 1/6 (vol/vol) de água bidestilada com 0,5 % de Triton X-100, agitando-se fortemente, colocou-

Métodos

se em gelo 10 min, centrifugou-se a 10000 g durante 5 min e aproveitou-se o sobrenadante que foi diluído 4000 vezes.

A actividade da catálase foi determinada com um método espectrofotométrico que monitoriza a decomposição do H_2O_2 a 240 nm ($E_{240} = 0,0034 \pm 0,0002$ litros/ $\text{mmol}^{-1}/\text{mm}^{-1}$). A diferença na absorvância (Δ_{240}) por unidade de tempo é uma medida da actividade da catálase. A temperatura ideal de ensaio é de 20 °C, o pH ideal é de 7,0 (79).

Os tecidos cerebrais e hepáticos foram homogeneizados com homogeneizador de Potter, em tampão de fosfatos 50 mM, pH 7,0 com 0,1 % de Triton X-100 (5 mL por grama de tecido). O homogeneizado era centrifugado a 10000 g durante 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes diluídos 10000 vezes (fígado) e 100 x (cérebro) com tampão de fosfatos 50 mM, pH 7,0 para o ensaio enzimático.

Em *cuvettes* de quartzo de 1 mL (Hellma, Alemanha) juntou-se 0,4 mL da fracção sobrenadante e 0,2 mL de tampão de fosfatos 50 mM, pH 7,0, para o branco; 0,4 mL da fracção sobrenadante e 0,2 mL de H_2O_2 30 mM em tampão de fosfatos, pH 7,0, para o ensaio. Após rápida mistura, monitorizou-se a diminuição da absorvância a 240 nm, durante 60 s (Spectronic Genesys 5, Reino Unido).

Determinou-se a quantidade de proteína presente nos sobrenadantes com o método de Bradford (80), por ligação das proteínas ao corante azul de Coomassie, usando como padrão a albumina bovina. A leitura realizou-se a 590 nm (Spectronic Genesys 5, Reino Unido).

Uma unidade de catálase é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar uma μmol de H_2O_2 por minuto. Os dados foram calculados em U/mg de proteína e expressos em percentagem do controlo.

Determinação da actividade da peroxidase da glutatona

Usou-se nesta determinação um *kit* Ransel (Randox Laboratories, Reino Unido) adaptado a um analisador automático de química clínica (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostics, Suíça). O método de base foi desenvolvido por Paglia e Valentine (81). A peroxidase da glutatona cataliza a oxidação da glutatona pelo hidroperóxido de cumeno. Na presença de redutase da glutatona e de NADPH, a glutatona oxidada é rapidamente convertida até à forma reduzida com a concomitante oxidação do NADPH até NADP^+ . Mede-se a diminuição da absorvância a 340 nm e desta forma a concentração da peroxidase da glutatona. Este *kit* usou-se em amostras de sangue completo, assim como nos sobrenadantes dos homogeneizados de cérebro e fígado obtidos de forma idêntica à já descrita para a determinação da catálase. Os resultados foram expressos em unidades/g de proteína (homogeneizados) ou unidades/g de hemoglobina (sangues). A quantificação da proteína realizou-se pelo método de Bradford já descrito. A quantificação da hemoglobina realizou-se pelo método espectrofotométrico da ciano-hemoglobina (82); a base do método reside na diluição do sangue numa solução de cianeto de potássio e ferricianeto de potássio, toda a hemoglobina passa então a cianometahemoglobina. A absorvância da solução é medida espectrofotometricamente a 540 nm (Spectronic Genesys 5, Reino Unido).



Determinação da actividade da dismútase do superóxido

Usou-se nesta determinação um *kit* Ransod (Randox Laboratories, Reino Unido) adaptado a um analisador automático de química clínica (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostics, Suíça). O método usa uma reacção entre a xantina e a oxidase da xantina para produzir radicais superóxido (O_2^-); estes radicais reagem com sais de p-iodonitrotetrazólio gerando um corante vermelho (formazano). A dismútase do superóxido presente na amostra compete com os sais de p-iodonitrotetrazólio pelos radicais O_2^- inibindo desta forma a formação do corante formazano. Uma unidade de dismútase de superóxido causa 50 % de inibição na taxa de redução dos sais de p-iodonitrotetrazólio nas condições do ensaio. Este *kit* usou-se em amostras de sangue completo, assim como nos sobrenadantes dos homogeneizados de cérebro e fígado obtidos de forma idêntica à já descrita para a determinação da catalase. Os resultados foram expressos em unidades/g de proteína (homogeneizados) ou unidades/ g de hemoglobina (sangues).

Determinação das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral.

Avaliou-se a peroxidação lipídica em homogeneizados de cérebro pela formação de compostos reactivos com o ácido tiobarbitúrico (TBARS – *thiobarbituric acid reactive substances*) tal como descrito por Buege e Aust (1978). Este método tem como princípio a reacção de uma molécula de malonildialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com formação de um complexo de cor vermelha estável (83). Pesou-se o cérebro inteiro (± 1500 mg) e colocou-se num tubo de homogeneização contendo 15 ml de ácido tricloroacético a 10 %. As amostras foram homogeneizadas (homogeneizador

Ultra-Turrax, Alemanha) até se obter uma suspensão homogênea e, em seguida, centrifugadas a 5000 g durante 20 segundos. Retiraram-se 600 μL de sobrenadante para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1 % (solução extemporânea). A mistura foi aquecida durante 10 minutos em banho de água até à ebulição e, após arrefecimento, leu-se a absorvância a 535 nm num espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5, Reino Unido). Os resultados foram expressos em nmol de malonildialdeído por g de cérebro, usando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinação de hidroperóxidos lipídicos

Os ensaios com este *kit* realizaram-se com o intuito de confirmar aqueles obtidos quando da determinação dos TBARS. Usou-se neste ensaio um *kit* Bioxytech LPO-560 (OxisResearch, E.U.A.). Este método baseia-se na oxidação pelos hidroperóxidos de iões Fe^{2+} a Fe^{3+} em meio ácido. Os iões Fe^{3+} ligam-se ao corante indicador (laranja de xilenol) formando um complexo estável que pode ser quantificado espectrofotometricamente a 560 nm (84).

Pesou-se o cérebro inteiro (± 1500 mg) e colocou-se num tubo de homogeneização contendo 15 ml de uma solução hidroxitolueno butilado (4mM) em tampão fosfato (10mM). As amostras foram homogeneizadas (homogeneizador Ultra-Turrax, Alemanha) até se obter uma suspensão homogênea e, em seguida, centrifugadas a 12000 g durante 1 minuto. Retirou-se o sobrenadante para ensaio imediato ou conservação a -80 °C até realização do ensaio de acordo com as instruções do fabricante.

Testes de avaliação de défice neurológico

Teste de sensibilidade posicional – puxou-se suavemente a pata traseira do rato abaixo do limite de uma mesa; quando solto o animal rapidamente levanta

a pata de volta à posição normal. Se houver défice neurológico o animal não consegue corrigir rapidamente a posição anormal em que se colocou a pata. Os animais incapazes de rapidamente retomarem a posição normal da pata foram classificados como positivos.

Teste de correcção da postura (*righting test*) – o rato colocado de costas sobre uma mesa imediatamente assume a posição corporal normal. Na presença de défice neurológico, o animal não consegue retomar a posição corporal normal no tempo limite de 5 segundos; quando foi esse o caso o animal foi classificado como positivo no teste.

Teste da tonicidade muscular – os animais normais apresentam uma certa tonicidade muscular facilmente identificável quando manuseados por um observador experiente; na presença de défice neurológico o animal apresenta tonicidade muscular diminuída caracterizada por hipotonia ou flacidez (85).

Testes vestibulomotores – usou-se uma versão modificada do teste do *rotarod* descrito por Hamm e colaboradores (86) de forma a avaliar alterações da função motora após traumatismo crânio encefálico. O teste consistiu em colocar os animais sobre um cilindro de neopreno recoberto com borracha com 5 cm de diâmetro, cuja velocidade de rotação pode ser ajustada pelo operador (*accelerator Rota-Rod 7750*; Ugo Basile, Itália). Inicialmente todos os animais foram treinados de forma a conseguirem equilibrar-se sobre o cilindro estacionário durante 20 segundos; uma vez iniciada a rotação do cilindro, a velocidade aumentava progressivamente de 3 rpm até 12 rpm para um tempo máximo de teste de 180 segundos. Só foram incluídos os animais que conseguiram efectuar com sucesso o teste na fase de treino.

Análise estatística dos resultados

Os resultados de todas as experiências em que se mediram variáveis contínuas são expressos pelas médias aritméticas e erros padrão da média. Alguns destes resultados são expressos em percentagem do controlo.

Para inferência estatística das diferenças entre dois grupos utilizou-se o teste *t* de *Student* para valores emparelhados ou independentes. Para comparações múltiplas utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Newman-Keuls* (87).

Para inferência estatística das diferenças na frequência de neurónios com mitocôndrias visíveis utilizou-se o teste *Chi* quadrado (com correcção de *Yate*).

Para inferência estatística das diferenças nos testes de sensibilidade posicional, correcção de postura e tonicidade muscular utilizou-se a regressão logística.

As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Fármacos e outras substâncias utilizados

Diazepam (Bialzepam, Bial, Portugal); cetamina (Ketalar, Pfizer (Parke-Davis, Portugal); sulfato de atropina ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$, B. Braun, Portugal); metacrilato de metilo (Vertex, Holanda); gadopentetato dimeglumina (Magnevist, Schering Lusitana, Portugal); cloreto de sódio (Merck, Alemanha); amilorido (Sigma-Aldrich, E.U.A.); dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, E.U.A.); cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, E.U.A.); Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, E.U.A.); peróxido de hidrogénio (Merck, Alemanha); heparina sódica 5000 U.I (B. Braun, Alemanha), ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

Resultados

Coloração do tecido cerebral pelo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

A análise das imagens digitais das fatias de cérebro obtidas 24 horas após o traumatismo (TCE, n=11) revelou uma diminuição significativa da área de tecido não corado pelo TTC ($12,71 \% \pm 1,45$, área branca expressa em percentagem, $p < 0,05$ *Newman-Keuls*) em comparação com as imagens obtidas dos controlos (CONT, $23,94 \% \pm 2,26$, n=9). A administração de GAD (TCEGAD, $21,47 \% \pm 1,02$, n=6) ou AMI (TCEAMI, $21,92 \% \pm 2,51$, n=6) 30 minutos após o trauma reverteu este efeito. A administração dos fármacos a animais controlo não traumatizados (CONTGAD, $24,1 \% \pm 1,98$, n=3; CONTAMI, $22,95 \% \pm 2,02$, n=3) não influenciou a coloração pelo TTC (ver Figura 2 e 3).

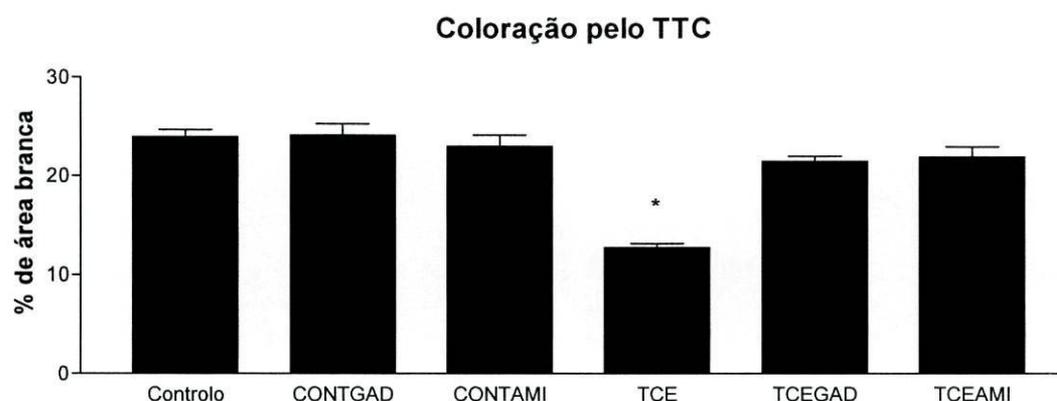


Figura 2 – Coloração pelo TTC. A % de área branca representa a superfície do tecido que não corou pelo TTC. * $p < 0,05$ em relação a todos os grupos (Newman-Keuls).

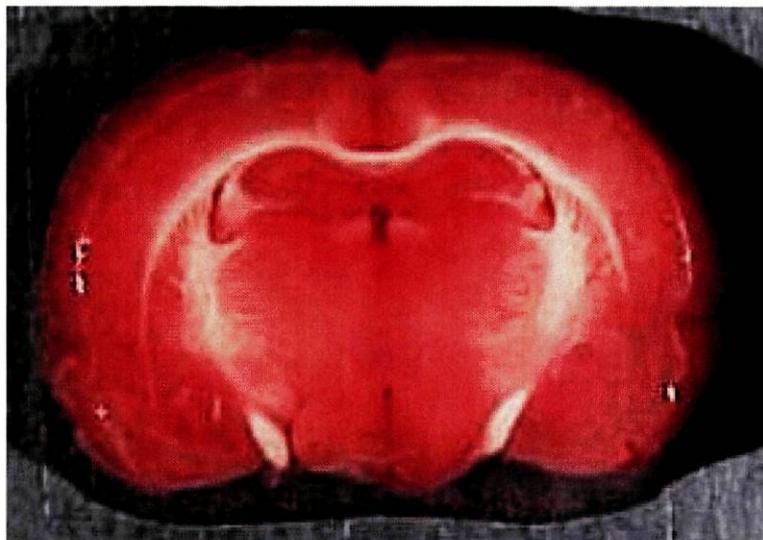


Figura 3 – Exemplo de fatia de cérebro corada pelo TTC.

Estudo morfológico

Resultados das avaliações morfométricas

A análise do estudo morfológico revelou que a percentagem de axónios com pelo menos uma mitocôndria foi significativamente superior no grupo TCE 24 horas após o traumatismo (52 %, n=4, 75 fotografias, 2443 axónios) relativamente ao grupo controlo (36,8 %, n=3, 30 fotografias, 6220 axónios, $p < 0,001$, *Chi* quadrado com correcção de *Yate*). A administração de GAD (TCEGAD, 51 %, n=4, 45 fotografias, 1890 axónios) ou AMI (TCEAMI, 56 %, n=4, 45 fotografias, 1978 axónios) não reverteu este parâmetro. Ver figura 4.

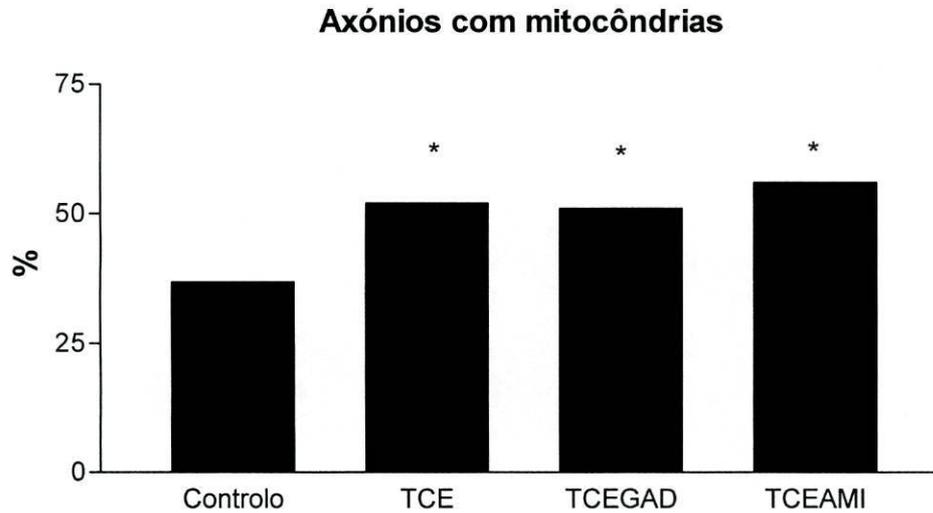


Figura 4 – Percentagem de axónios em que se observou pelo menos uma mitocôndria. * significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$, Chi quadrado com correcção de Yate).

Observou-se ainda que o diâmetro médio das mitocôndrias nos axónios dos animais com TCE ($0,520 \pm 0,003 \mu\text{m}$) era significativamente maior do que nos controlos ($0,368 \pm 0,006 \mu\text{m}$; $p < 0,001$, teste *t* de Student). Ver figura 5 e 6A (cabeças de seta).

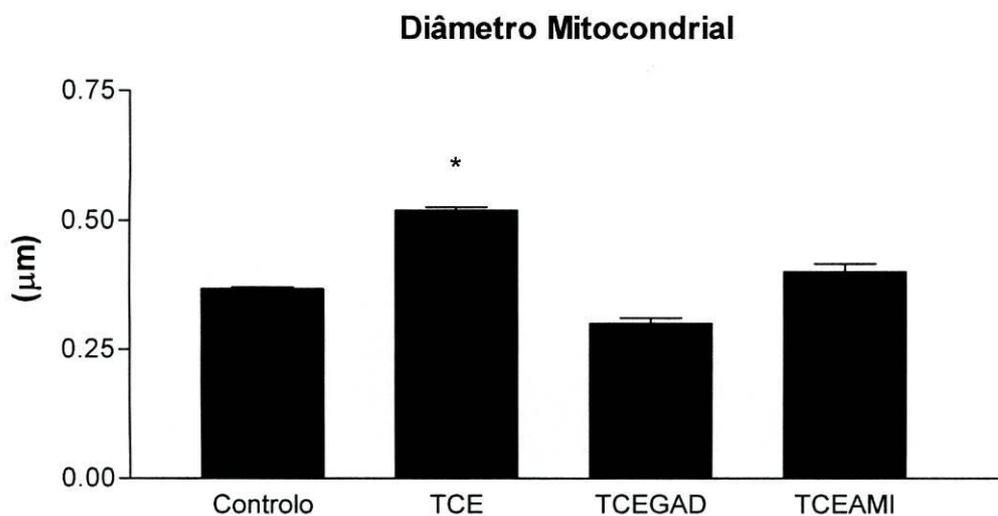


Figura 5 – Diâmetro mitocondrial médio medido em fotografias de tecido cerebral. * significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$).

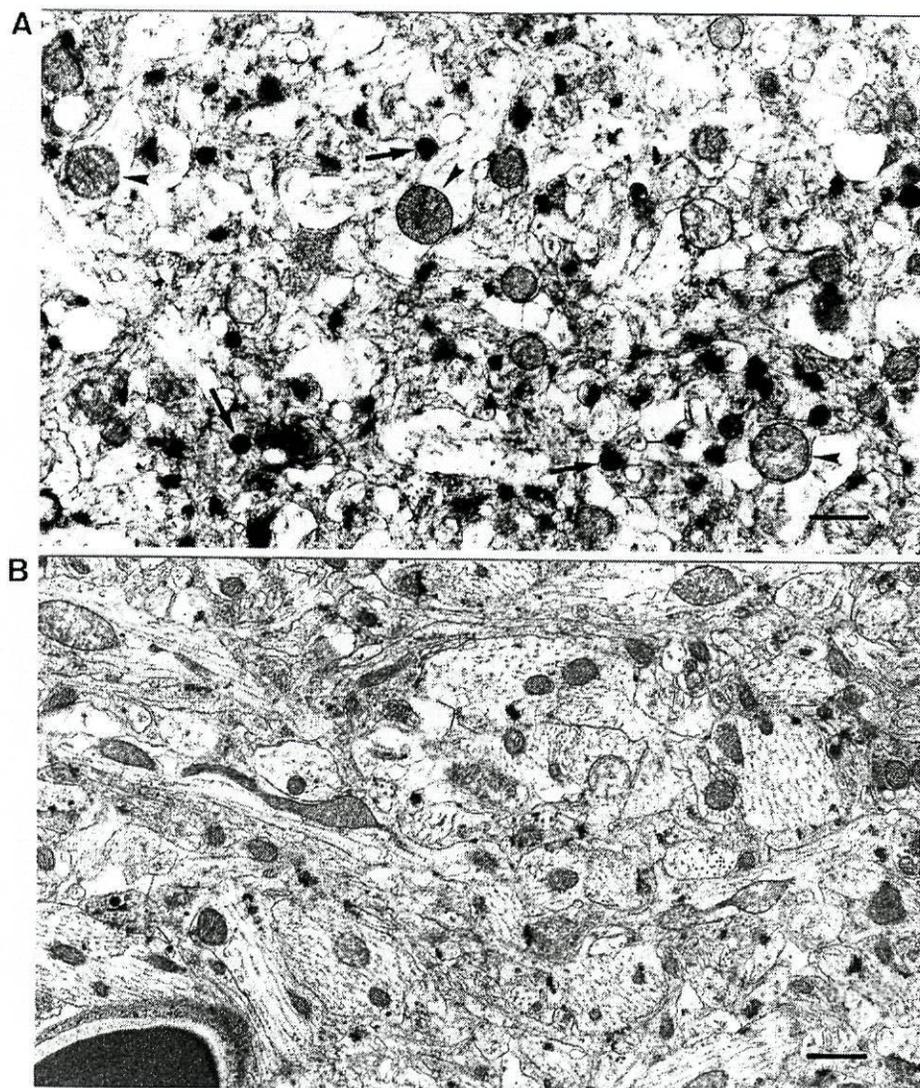


Figura 6 - Imagens de microscopia electrónica do cíngulo de cérebros de rato. Nos animais submetidos a TCE os neurónios apresentam o citoplasma mais claro e com mitocôndrias de maior diâmetro (cabeças de flecha). Observa-se ainda grande quantidade de peroxissomas (flechas) (A) por comparação com o animal controlo (B). Barras: 1 μm.

Verificou-se que o número de peroxissomas por fotografia foi significativamente maior nos animais com TCE ($10,58 \pm 1,18$, $n=75$) do que nos controlos ($0,19 \pm 0,08$, $n=30$; $p < 0,001$, teste t de *Student*). Este aumento não se

manifestou nos animais traumatizados tratados com GAD (TCEGAD, $0,26 \pm 0,1$, $n=19$) ou AMI (TCEAMI, $0,73 \pm 0,15$, $n=26$). Ver figuras 6 e 7.

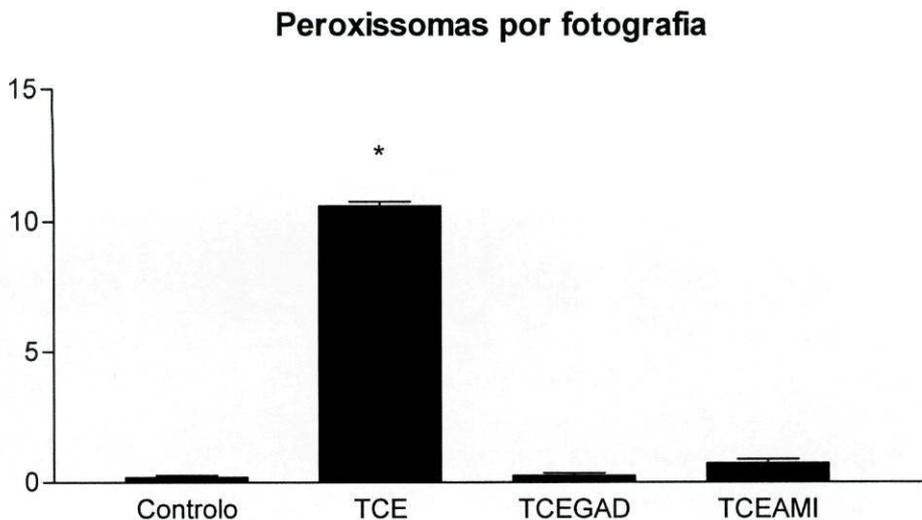


Figura 7 – Número de peroxissomas por fotografia. * $p < 0,001$

Actividade da catálase cerebral

Animais não perfundidos com soro fisiológico

Os valores de actividade da catálase cerebral estão expressos como percentagem do controlo na figura 8. O TCE ($328 \% \pm 58$, $n=11$; $p < 0,05$, *Newman-Keuls*) aumentou a actividade da catálase em comparação com os controlos ($100 \% \pm 7$, $n=6$), sendo o efeito revertido pela administração de GAD ($161 \% \pm 14$, $n=6$) ou AMI ($183 \% \pm 11$, $n=6$) administrados trinta minutos após o traumatismo. Nenhum dos fármacos alterou significativamente a actividade da catálase em ratos controlo (CONTGAD, $154 \% \pm 18$; CONTAMI, $140 \% \pm 30$, $n=3$ para os dois grupos).

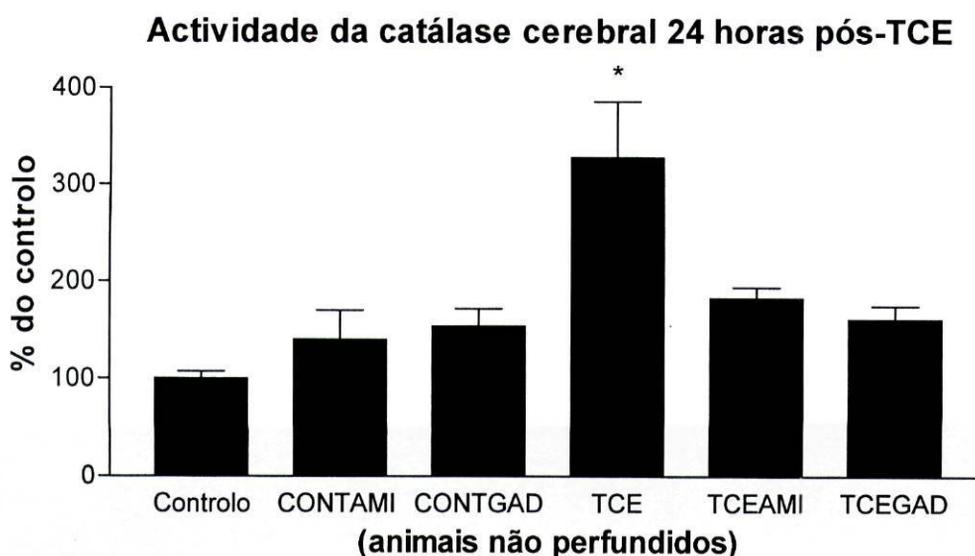
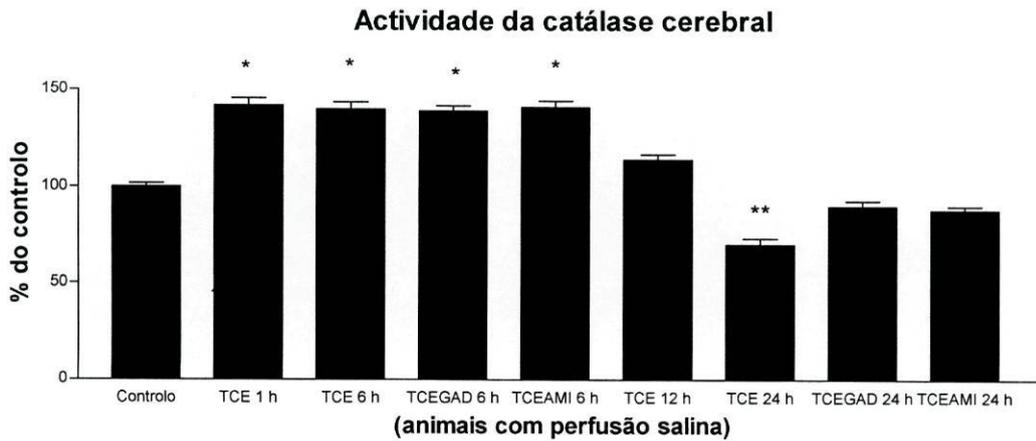


Figura 8 - Actividade da catálase cerebral em animais sem perfusão salina prévia à recolha do tecido cerebral. * $p < 0,05$, Newman-Keuls.

Animais perfundidos com soro fisiológico

Os valores de actividade da catálase dos ratos sujeitos a perfusão salina prévia à recolha do tecido cerebral são apresentados em percentagem do controlo na figura 9. O traumatismo aumentou significativamente a actividade da catálase até 6 horas após o TCE (140 % \pm 9, $p < 0,05$ Newman-Keuls); a administração de GAD (139 % \pm 7) ou AMI (141 % \pm 8) trinta minutos após o TCE não reverteu este efeito. Doze horas após o traumatismo a actividade da catálase (TCE 12 h, 114 % \pm 7) diminuiu até valores não diferentes dos controlos (Controlo, 100 % \pm 4) e às 24 horas a actividade (70 % \pm 8, $p < 0,05$ Newman-Keuls) era significativamente menor do que nos controlos. A actividade da catálase cerebral 24 horas após o TCE nos animais que receberam GAD (TCEGAD 24 h, 90 % \pm 7) ou AMI (TCEAMI 24 h, 88 % \pm 5) trinta minutos após o traumatismo não foi diferente da observada nos controlos ($n=6$ para todos os grupos).



*Figura 9 - Actividade da catálase cerebral em animais com perfusão salina prévia à recolha do tecido cerebral. Neste gráfico é possível observar o comportamento da actividade da enzima 1, 6, 12 e 24 horas após o TCE. * e ** $p < 0,05$ em relação ao controlo, Newman-Keuls.*

Actividade da catálase hepática

Os valores da actividade da catálase hepática, 24 horas após o TCE, com perfusão salina prévia à recolha dos tecidos, manifestaram um comportamento similar ao observado para a catálase cerebral (ver figura 10). O traumatismo levou à diminuição significativa da actividade da enzima (TCE, 85 % \pm 5; $p < 0,05$, *Newman-Keuls*) por comparação com os controlos (100 % \pm 3,46). O tratamento com GAD (TCEGAD, 103 % \pm 7,84) ou AMI (TCEAMI, 104.1 % \pm 7,96) reverteu este efeito.

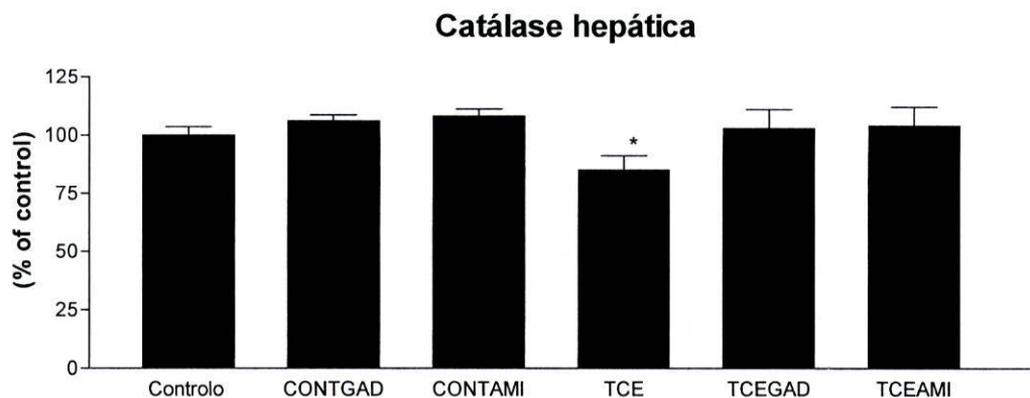


Figura 10 – Actividade da catálase hepática 24 horas após o traumatismo em animais com perfusão salina prévia à recolha do tecido. * $p < 0,05$, Newman-Keuls.

Actividade da catálase eritrocitária

A actividade da catálase eritrocitária, 24 horas após o traumatismo (TCE, 78 % \pm 3; $p < 0,05$ Newman-Keuls), revelou-se significativamente menor do que nos controlos sem TCE (Controlo, 100 % \pm 8). A administração de GAD reduziu significativamente a actividade da enzima nos controlos sem trauma (CONTGAD, 80 % \pm 5; $p < 0,05$ Newman-Keuls) e não reverteu a quebra observada nos TCE (TCEGAD, 83 % \pm 5; $p < 0,05$ Newman-Keuls) sem contudo a agravar (n=6 para todos os grupos; ver figura 11).

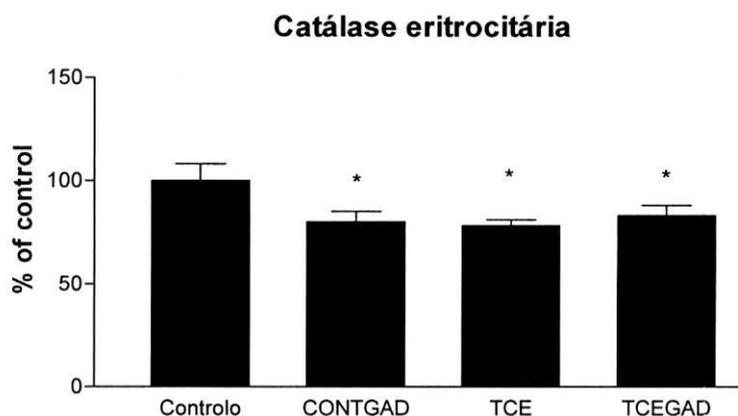


Figura 11 – Actividade da catálase eritrocitária. * $p < 0.05$, Newman-Keuls.

Actividade da peroxidase da glutathiona cerebral

Os resultados do *kit* Ransel aplicados aos homogeneizados de cérebro podem ser observados na figura 12 ($n = 6$ para todos os grupos). De todos os grupos analisados, só o grupo CONTAMI ($108 \% \pm 4$; $p < 0,05$, *Newman-Keuls*) evidenciou um aumento significativo da actividade da enzima em comparação com os grupos controlo (100 ± 3), TCE ($95 \% \pm 3$) e TCEGAD ($93 \% \pm 2$).

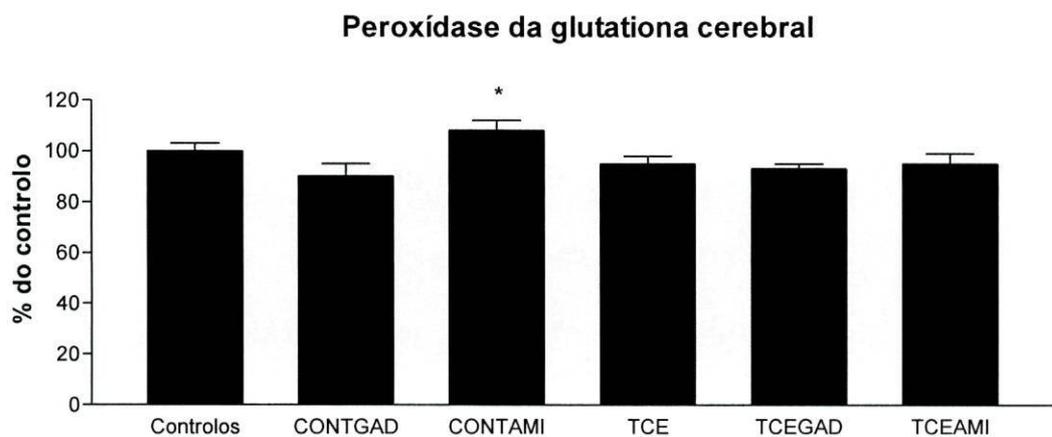


Figura 12 – Actividade da peroxidase da glutathiona cerebral. * $p < 0,05$, *Newman-Keuls*.

Actividade da peroxidase da glutathiona hepática

Os resultados obtidos nos homogeneizados de fígado com o *kit* Ransel podem ser observados na figura 13 ($n=6$ para todos os grupos). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.



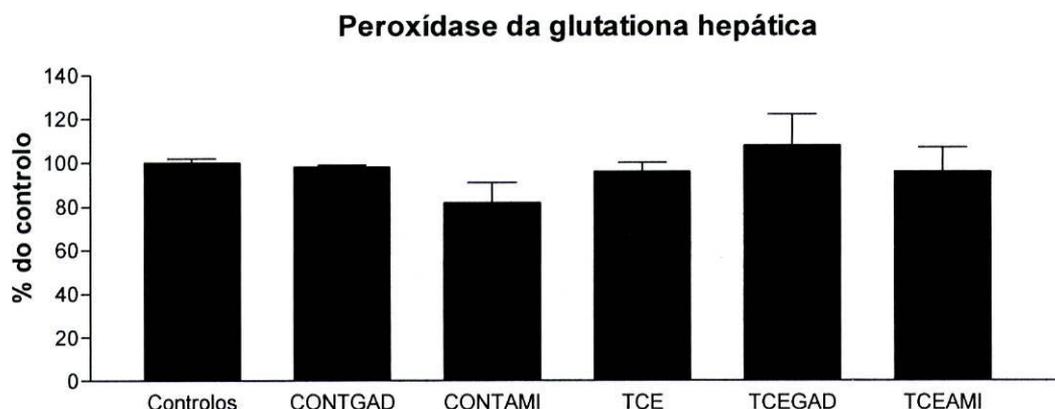


Figura 13 – Actividade da peroxidase da glutatona em homogeneizados de fígado.

Actividade da peroxidase da glutatona no sangue

Os resultados obtidos nas amostras de sangue com o *kit* Ransel podem ser observados na figura 14 (n=6 para todos os grupos). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

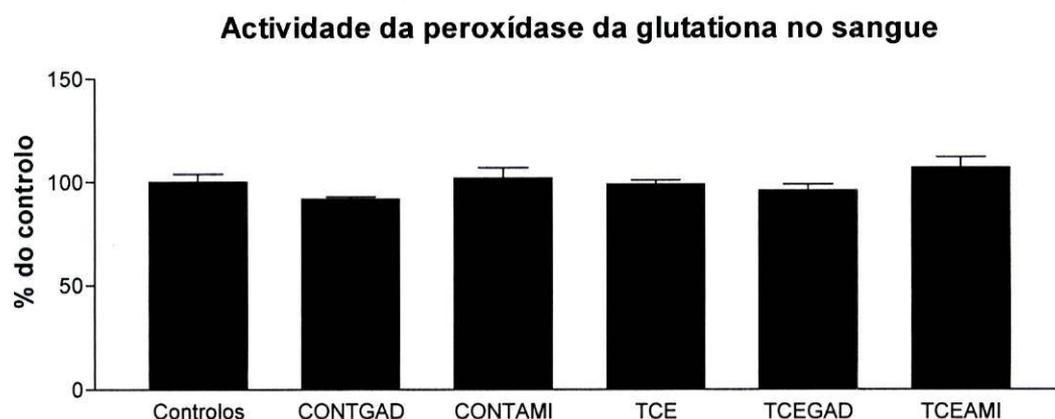


Figura 14 – Actividade da peroxidase da glutatona no sangue.

Actividade da dismutase do superóxido cerebral

Os resultados obtidos nos homogeneizados de cérebro com o *kit* Ransod podem ser observados na figura 15 (n=6 para todos os grupos). O grupo CONTAMI (108 % ± 4; p <0.05, *Newman-Keuls*) foi o único a evidenciar um

aumento significativo da actividade da enzima em comparação com todos os grupos analisados (CONT, 100 % \pm 3; CONTGAD, 90 % \pm 5; TCE, 95 % \pm 3; TCEGAD, 93 % \pm 2; TCEAMI, 95% \pm 4; $p < 0.05$).

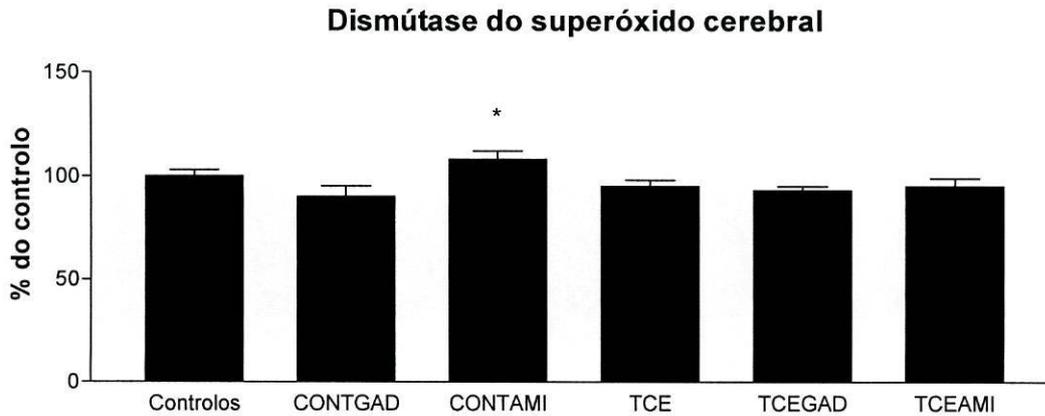


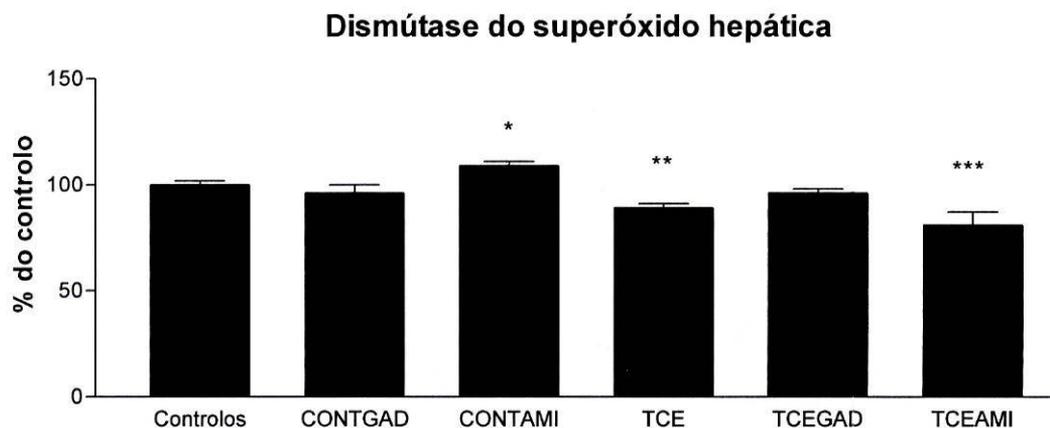
Figura 15 – Actividade da dismutase do superóxido cerebral. * $p < 0,05$ em relação a todos os grupos.

Actividade da dismutase do superóxido hepática

Os resultados obtidos nos homogeneizados de fígado com o *kit* Ransod podem ser observados na figura 16 ($n=6$ para todos os grupos). Numa análise conjunta de todos os grupos, o grupo CONTAMI (109 % \pm 2; $p < 0,05$, *Newman-Keuls*) evidenciou um aumento significativo da actividade da enzima em comparação com todos os grupos analisados (CONT, 100 % \pm 2; CONTGAD, 96 % \pm 4; TCE, 89 % \pm 2; TCEGAD, 96 % \pm 2; TCEAMI, 81% \pm 6). No grupo TCEAMI a actividade da enzima foi significativamente menor em relação a todos os grupos excepto o TCE.

Contudo, se excluirmos os grupos tratados com amilorido da análise estatística, o TCE diminuiu significativamente a actividade da enzima em comparação com

o grupo controlo ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*); o tratamento com GAD reverteu este efeito.



*Figura 16 – Actividade da dismutase do superóxido hepática. * $p < 0.05$ em relação a todos os grupos. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo controlo quando da análise estatística se retiram os grupos tratados com amilorido. *** $p < 0.05$ em relação a todos os grupos excepto o grupo TCE.*

Actividade da dismutase do superóxido no sangue

Os resultados obtidos nas amostras de sangue com o *kit* Ransod podem ser observados na figura 17. A actividade da enzima diminuiu significativamente 24 horas após o traumatismo (TCE, $70 \% \pm 10$, $p < 0.05$, *Newman-Keuls*) em comparação com os grupos controlo ($100 \% \pm 7$), CONTGAD ($101 \% \pm 6$) e CONTAMI ($110 \% \pm 11$); o tratamento com GAD ou AMI reverteu de forma significativa este efeito (TCEGAD, $96 \% \pm 5$; TCEAMI, $114 \% \pm 8$); $n=6$ para todos os grupos.

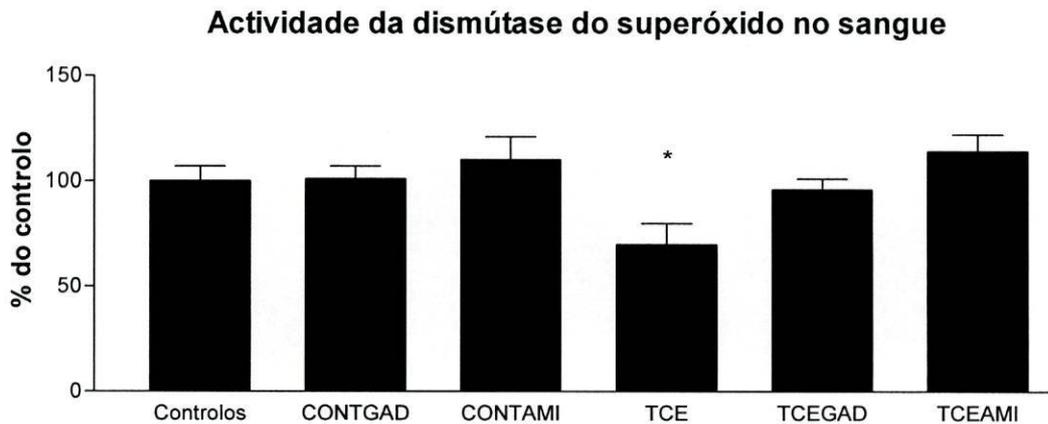


Figura 17 – Actividade da dismutase do superóxido no sangue. * $p < 0.05$ em relação a todos os grupos, Newman-Keuls.

Avaliação da peroxidação lipídica

Determinação das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral.

Vinte e quatro horas após o traumatismo, a produção de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral aumentou significativamente (TCE, 26,81 nmol/g cérebro \pm 2,19; $p < 0,05$, Newman-Keuls) em comparação com os controlos (18,25 nmol/g cérebro \pm 1,25). O tratamento com GAD (TCEGAD, 13,41 nmol/g cérebro \pm 1,80) ou AMI (17,48 nmol/g cérebro \pm 1,77) reverteu este efeito. A administração de GAD a animais controlo reduziu significativamente a produção de TBARS (CONTGAD, 9,26 nmol/g cérebro \pm 0,66; $p < 0,05$, Newman-Keuls), efeito não observado nos controlos aos quais se administrou amilorido (CONTAMI, 17,54 nmol/g cérebro \pm 1,39); $n = 8$ para todos os grupos. Ver figura 18.

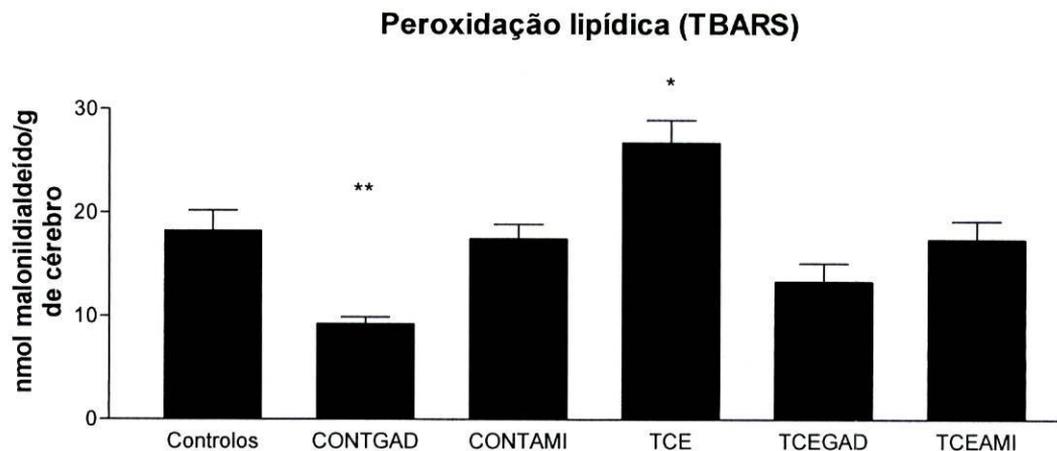


Figura 18 – Determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cerebral. * e ** $p < 0,05$ em relação a todos os grupos, Newman-Keuls.

Determinação de hidroperóxidos lipídicos

Os resultados obtidos confirmaram a peroxidação lipídica observada pelo método TBARS. Desta forma, 24 horas após o traumatismo, a produção de hidroperóxidos lipídicos aumentou significativamente (TCE, $38,5 \mu\text{M} \pm 3,59$) em comparação com os controlos ($21,80 \mu\text{M} \pm 2,9$). O tratamento com GAD (TCEGAD, $19,1 \mu\text{M} \pm 0,39$) ou AMI ($23,1 \mu\text{M} \pm 0,51$) reverteu este efeito; $n = 4$ para todos os grupos. Ver figura 19.

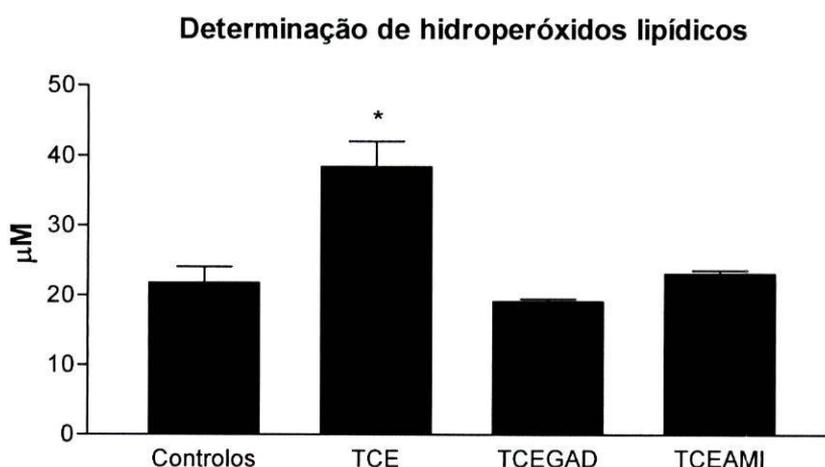


Figura 19 - Determinação de hidroperóxidos lipídicos no tecido cerebral.

* $p < 0,05$ em relação a todos os grupos, Newman-Keuls.

Testes de avaliação de défice neurológico

Não se observaram diferenças entre os vários grupos para os testes de sensibilidade posicional e de correcção da postura (*righting test*).

No teste da tonicidade muscular, o grupo TCE apresentou uma diminuição significativa da tonicidade muscular em comparação com o controlo ($p < 0,05$).

O tratamento com GAD ou amilorido reverteu este efeito em animais com traumatismo (Ver tabela 1). A administração dos fármacos a animais controlo não alterou a tonicidade muscular.

Tabela 1 – Efeito do TCE e do tratamento com amilorido ou GAD após o traumatismo na tonicidade muscular.

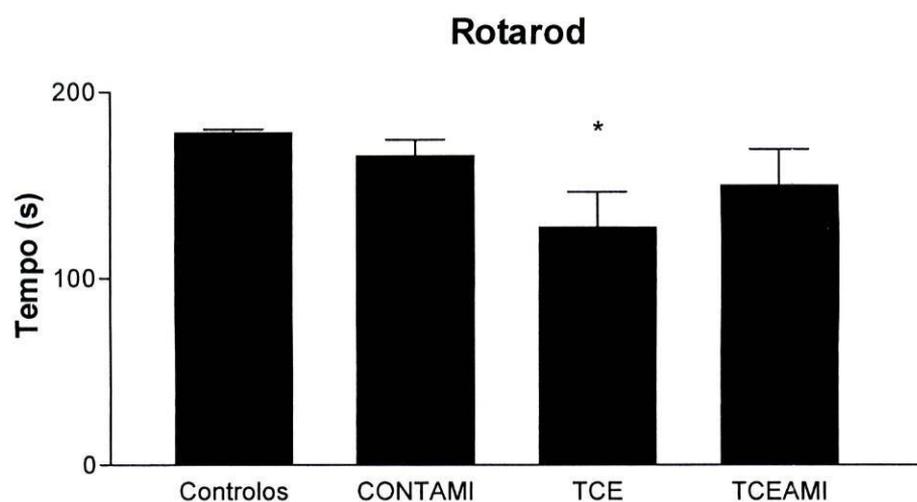
Tonicidade muscular

			Tratamento			Total
			TCE	TCEGAD	TCEAMI	
Tonicidade muscular	normal	n	2	6	4	12
		%	20,0%	54,5%	66,7%	44,4%
	reduzida	n	8	5	2	15
		%	80,0%	45,5%	33,3%	55,6%
Total		n	10	11	6	27
			100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Testes vestibulomotores – no teste do *rotarod* observou-se uma diminuição significativa do tempo de desempenho após o traumatismo (TCE, 127,41 s \pm 18,65, n = 12; controlo, 178,13 s \pm 1,89, n = 8, $p < 0,05$). Não se observaram diferenças significativas em relação aos grupos CONTAMI (165,5 s \pm 8,62, n = 6) e TCEAMI (149,8 s \pm 19,27, n = 6), ver figura 20. Não se consideraram para este teste animais tratados com GAD; a forma de administração (i.v., na veia

jugular) condiciona alguma limitação de movimento da pata dianteira do lado da injeção e esta situação impede o normal desempenho dos animais no teste.

*Figura 20 – Teste vestibulomotor do rotarod. * $p < 0,05$ em comparação com o controlo.*



Discussão

Cálcio intracelular e lesão neuronal

São já conhecidos múltiplos mecanismos responsáveis por danos no sistema nervoso central desencadeados pela isquemia e/ou pelo traumatismo. É actualmente consensual a importância que a regulação do cálcio intracelular tem nos processos fisiopatológicos da lesão neuronal. Apesar da lesão celular poder ocorrer sem perda da homeostasia do Ca^{2+} , muitos dos processos chave dessa lesão, passíveis de intervenção fármaco-terapêutica, envolvem este ião (88). A compreensão do papel do cálcio nos mecanismos que desencadeiam a lesão celular teve como contributo inicial a observação no tecido hepático da formação de depósitos de cálcio em áreas com necrose tecidual (89). Outros autores mostraram que hepatócitos em cultura morriam quando expostos a várias toxinas, na presença, mas não na ausência de cálcio no meio extracelular. Estes autores concluíram que a entrada de Ca^{2+} nas células seria um requisito essencial para a expressão da toxicidade, designando este processo como via comum final da morte celular (90). Estudos efectuados em culturas de tecidos mostraram que a amputação de axónios levava à degeneração dos mesmos só quando o Ca^{2+} estava presente no meio de cultura (91). Trabalhos mais recentes demonstraram que a neurodegeneração induzida por neurotoxinas como a capsaicina e o aminoácido excitatório glutamato estava associada a aumentos da concentração de cálcio nos tecidos (92). Múltiplos trabalhos realizados em culturas de neurónios assim como em fatias de cérebro têm confirmado a relação entre a toxicidade observada e a concentração de Ca^{2+} no meio extracelular (40, 93-96). Estudos efectuados *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a associação entre o influxo de

cálcio e os danos observados nos tecidos neuroniais. A título de exemplo, temos modelos experimentais de lesão da espinal-medula que produzem acumulação de Ca^{2+} nos axónios da substância branca, activando vias enzimáticas responsáveis pela lesão observada (97, 98). Modelos de epilepsia, isquemia e trauma cerebral parecem também precipitar a acumulação de Ca^{2+} intracelular (99-102). As lesões desencadeadas pelo Ca^{2+} parecem desempenhar um papel central no sistema nervoso dos mamíferos (88).

Todas as células dos mamíferos usam o Ca^{2+} como sinalizador em inúmeros processos vitais, tais como o controlo do crescimento e diferenciação celular (103-105), a manutenção da integridade do citoesqueleto (106, 107), a excitabilidade de membrana (108, 109), a exocitose e a actividade sináptica (110, 111). Devido ao papel central do Ca^{2+} como regulador da normal função neuronal, os neurónios desenvolveram mecanismos homeostáticos de forma a controlar rigidamente tanto a localização intracelular como a concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre. Estes mecanismos consistem numa complexa interacção entre várias classes de eventos: influxo de Ca^{2+} , tamponamento de Ca^{2+} , armazenamento interno de Ca^{2+} e efluxo de Ca^{2+} . Um quinto processo, a difusão intracelular de Ca^{2+} , permite a ligação entre todos os outros sendo por isso também crucial na homeostasia deste ião. A actuação conjunta destes mecanismos mantém a concentração intracelular de Ca^{2+} a um nível 10^5 vezes inferior ao da concentração extracelular, de tal forma que aumentos da concentração de Ca^{2+} relativamente pequenos ou localizados podem ser usados pela célula para activar um efeito fisiológico, tal como a activação de uma enzima ou de um canal iónico. Do ponto de vista fisiológico, o delicado equilíbrio entre estes cinco processos permite a regulação

intracelular independente de múltiplas vias dependentes do Ca^{2+} . A manutenção deste equilíbrio é o objectivo de todas as estratégias fármaco-terapêuticas destinadas a diminuir a neurotoxicidade do Ca^{2+} . Os mecanismos que conduzem à neurotoxicidade podem ser divididos em duas etapas. A primeira etapa consiste nos mecanismos patológicos que desencadeiam e sustentam o excesso intracelular de Ca^{2+} , enquanto que a segunda consiste nos fenómenos secundários que se pensa resultarem do excesso intracelular de Ca^{2+} . Esta classificação tem relevância terapêutica, pois a maioria das estratégias fármaco-terapêuticas para o TCE podem ser classificadas sob uma destas categorias. Deste modo, alguns fármacos são dirigidos ao bloqueio da entrada de Ca^{2+} nas células (ex.: bloqueadores dos canais de cálcio), enquanto que outros são dirigidos às consequências deste excesso de Ca^{2+} (ex.: antioxidantes) (88).

Canais iónicos mecano-sensíveis no TCE

Dados recentes sugerem que a deformação traumática dos axónios é responsável por um influxo anormal de sódio através de canais de Na^+ mecano-sensíveis. Esta situação desencadeia um aumento do Ca^{2+} intracelular através da abertura de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e da reversão do trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (112). Já se demonstrou que a sobrecarga neuronal de Ca^{2+} dependia da gravidade do traumatismo (113). Outros autores, usando neurónios sensitivos de Rato, concluíram que a estimulação mecânica provocava um influxo de Ca^{2+} através de canais iónicos mecano-sensíveis. Este aumento foi evitado quando se usou Gd^{3+} (93).

Bloqueadores dos canais iónicos mecano-sensíveis no TCE

No caso particular do trabalho desta dissertação, a estratégia centrou-se numa intervenção fármaco-terapêutica de primeira etapa, isto é, tentando atenuar a perturbação iónica pós-TCE pelo bloqueio de canais iónicos mecano-sensíveis. Este bloqueio poderia evitar, pelo menos parcialmente, a cascata de eventos metabólicos que resultam em danos oxidativos. Em princípio, quanto mais precoce a intervenção, menor será a perturbação da homeostasia iónica intracelular, o que justifica a administração o mais precoce possível dos fármacos usados.

Não existem inibidores ou activadores específicos dos canais iónicos mecano-sensíveis. Contudo, bloqueadores não específicos como o gadolínio e o amilorido têm sido usados com eficácia na inibição da permeabilidade a cationes em canais iónicos mecano-sensíveis de múltiplos tecidos (114-123). O Gd^{3+} bloqueia os canais iónicos mecano-sensíveis ao ligar-se ao local na via de passagem para o Na^+ e Ca^{2+} . O cation Gd^{3+} é considerado como o mais potente bloqueador de canais iónicos mecano-sensíveis, é um bloqueador não selectivo e a sua toxicidade limita o seu uso a preparações *in vitro* (124). Alguns autores defendem que o Gd^{3+} pode inibir canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (125); este facto pode contribuir para os efeitos observados no nosso trabalho, uma vez que se sabe que estes canais estão envolvidos no desequilíbrio iónico axonal pós-estiramento (112). Muitos investigadores usam o cloreto de gadolínio ($GdCl_3$) como bloqueador dos canais iónicos mecano-sensíveis porque uma vez no organismo, este se dissocia rapidamente em Gd^{3+} e $3Cl^-$. A razão pela qual não utilizámos o $GdCl_3$ nos nossos trabalhos reside no facto de este composto ser extremamente tóxico, o que limita o seu

uso como eventual agente terapêutico. As principais lesões associadas à administração do $GdCl_3$ são a deposição mineral no leito capilar (particularmente nos pulmões e rins), a fagocitose de minerais pelo sistema fagocítico mononuclear, a necrose esplênica e hepatocelular seguida de mineralização distrófica, a mineralização da mucosa glandular fúndica sem necrose seguida de hiperplasia das células mucosas, a diminuição da contagem de plaquetas e aumento do tempo de protrombina e do tempo de activação parcial de tromboplastina. A análise ultraestrutural e radiológica do baço e fígado revelou depósitos electrão-densos, constituídos por gadolínio, cálcio e fosfatos, nos macrófagos esplênicos, células de Kupffer e hepatócitos (126).

A escolha do gadopentetato dimeglumina (GAD, Magnevist) como agente bloqueador dos canais iónicos mecano-sensíveis nos nossos trabalhos baseou-se na seguinte informação: o sal de dimeglumina do complexo GAD é um composto com muito baixa toxicidade, tanto no Homem como noutros animais (127); também já se demonstrou a abertura temporária da barreira hemo-encefálica no modelo de trauma usado nesta dissertação; para o efeito recorreu-se à imagiologia por ressonância magnética nuclear após a administração de GAD. Este trabalho mostrou que o GAD pode atravessar a barreira hemo-encefálica após o TCE (128); vários autores demonstraram que pequenas quantidades de Gd^{3+} podem ser libertadas *in vivo* a partir do complexo GAD e esta libertação parece ser consequência de reacções de transmetalção com o Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} (129, 130). Os dados da literatura sugerem que o GAD tem baixa toxicidade, que pode atravessar a barreira hemo-encefálica após o TCE e que ainda pode libertar o Gd^{3+} *in vivo*; parecem

ainda apoiar a ideia de que no modelo de TCE usado nesta dissertação, os canais iónicos mecano-sensíveis podem ser bloqueados após a administração de GAD. Os nossos resultados parecem suportar este conceito.

O raciocínio que levou à escolha do amilorido foi similar ao da escolha do GAD: o amilorido é um conhecido bloqueador dos canais iónicos mecano-sensíveis sendo frequentemente usado como ferramenta farmacológica no seu estudo (37, 115); como já foi mencionado, sabemos que ocorre a abertura temporária da barreira hemo-encefálica neste modelo de TCE (128). Com base nestes dados considerámos como possível que o amilorido, tal como o GAD, possa atingir o cérebro bloqueando estes canais. Mais uma vez, os nossos resultados parecem apoiar este conceito.

A questão de qual dos processos associados com a lesão axonal constitui o melhor alvo de intervenção terapêutica permanece em aberto. A interligação de múltiplos factores como a capacidade de tamponamento do cálcio, o facto da lesão ser generalizada ou focalizada, o equilíbrio entre produção e necessidades de energia, a duração da lesão axonal e a magnitude da sobrecarga de Ca^{2+} influenciam o resultado final (131). A terapêutica com maior potencial de benefício deverá actuar em alvos que serão activados antes da ocorrência de danos estruturais irreversíveis no axónio, como é o caso do bloqueio de canais de sódio e de cálcio (41, 132). Este dado ajuda a sustentar a escolha dos fármacos usados no nosso trabalho.

Coloração do tecido cerebral pelo TTC

A coloração do tecido cerebral com sais de tetrazólio tem sido frequentemente utilizada como forma simplificada de avaliação de danos isquémicos em

modelos experimentais. O uso desta técnica tem por objectivo ser uma alternativa às morosas técnicas histológicas convencionais de avaliação do volume de lesão. A facilidade de execução levou ao seu uso por vários grupos na delimitação da área com enfarte cerebral (22, 24, 133). Também suscitou interesse como ferramenta de teste rápido para compostos potencialmente neuroprotectores (24, 134). A eficácia farmacológica dos compostos neuroprotectores é nestes casos demonstrada pela diminuição do volume da lesão. Este método já foi também utilizado na quantificação do volume de lesão num modelo experimental de TCE no Rato (26). Contudo, este modelo de traumatismo produzia lesão focal, um tipo de lesão diferente da lesão axonal difusa obtida com o modelo de TCE usado nesta dissertação. Como a coloração do tecido pelo TTC depende da redução deste composto pela desidrogénase do succinato mitocondrial, formando o composto vermelho formazano (135), pareceu-nos interessante avaliar se esta técnica permitiria medir alterações metabólicas num modelo de lesão axonal difusa. Observámos um aumento da actividade da desidrogénase do succinato em regiões cerebrais que não apresentavam actividade quantificável nos animais controlo. Este aumento de actividade ocorreu fundamentalmente em áreas com predomínio de feixes axonais e foi revertido nos animais que receberam o GAD ou o amilorido após o TCE. A análise destes resultados assim como dos resultados do estudo ultraestrutural, que será discutido adiante, permitem-nos concluir que ocorreu acumulação de mitocôndrias nesses feixes axonais, que a desidrogénase do succinato mitocondrial se encontrava activa 24 horas após o TCE e que a administração de GAD ou amilorido após o TCE revertia o aumento da actividade da desidrogénase do succinato nos feixes axonais. A

acumulação de organelos nos axónios por alterações do citoesqueleto é característica da lesão axonal difusa (46). Nos nossos resultados, o aumento de coloração pelo TTC pode ser explicado pela acumulação de mitocôndrias nos feixes axonais, uma vez que o TCE aumentou significativamente o número de axónios com pelo menos uma mitocôndria. Desta forma, pensamos que a coloração pelo TTC pode ser utilizada como marcador deste tipo de lesão. A clara reversão, nos animais tratados, da coloração pelo TTC dos feixes axonais, não foi acompanhada de uma diminuição equivalente no parâmetro “número de axónios com pelo menos uma mitocôndria”. Este parâmetro morfométrico só permite medir grandes variações da presença destes organelos nos feixes axonais, não permitindo avaliar alterações do número total de mitocôndrias por fotografia. No entanto, sabemos que nos animais tratados após o TCE o número de peroxissomas por fotografia não era diferente dos controlos, o que, pensamos, traduz uma redução na acumulação destes organelos nos feixes axonais. É necessário ainda considerar que outros factores podem afectar a coloração e conseqüentemente a interpretação dos resultados; a activação da microglia, assim como a infiltração de leucócitos e macrófagos como resposta à agressão inicial, foi descrita em vários modelos de isquemia cerebral e de TCE, incluindo o usado nesta dissertação (11, 136). A actividade mitocondrial destas células pode aumentar significativamente a coloração pelo TTC (23). Deste modo, uma eventual redução da infiltração de macrófagos na área lesada poderia ajudar a explicar a redução na coloração observada nos animais tratados após o TCE.

A reversão pelos fármacos do edema mitocondrial observado após o TCE sugere o papel protector destes compostos e não uma interferência na normal

actividade metabólica da mitocôndria. A eventual utilização da coloração pelo TTC na avaliação de fármacos neuroprotectores poderá ser ponderada como ferramenta de rastreio inicial, não dispensando o uso de técnicas mais complexas que confirmem ou infirmem os resultados observados.

A mitocôndria no TCE

As mitocôndrias são simultaneamente fontes e alvos do stresse oxidativo. Em condições normais até 2% do oxigénio consumido pela cadeia respiratória mitocondrial pode ser reduzido, normalmente por acção da coenzima Q na forma de semiquinona, formando o radical superóxido e subsequentemente outras espécies reactivas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo (137). Quando ocorre lesão do sistema nervoso central, a mitocôndria ocupa uma posição fulcral na sobrevivência ou morte neuronal, uma vez que este organelo é simultaneamente regulador do metabolismo energético e dos mecanismos apoptóticos (138, 139). Uma fracção significativa da glicose libertada pela vasculatura cerebral é transportada para os astrócitos e convertida a lactato pela glicólise. Muito deste lactato é depois exportado para os neurónios vizinhos onde é convertido até piruvato. O piruvato sofre então descarboxilação oxidativa até acetil-CoA pela acção do complexo da desidrogenase do piruvato localizado na matriz mitocondrial. Este complexo é particularmente sensível à inactivação oxidativa; esta reacção é particularmente importante no sistema nervoso central, uma vez que este depende fortemente do metabolismo glicídico e a actividade catalizada por este complexo representa a única ponte entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico. O acetil-CoA actua como o principal combustível para oxidação no ciclo dos

ácidos tricarboxílicos, que é a principal fonte dos electrões para a cadeia respiratória mitocondrial, servindo desta forma como o mais importante combustível para a fosforilação oxidativa. A direccionalidade astrocítica-neuronal deste processo parece ser promovida por isoenzimas selectivas de cada tipo celular (138, 140-142). Esta via é também sustentada pelas elevadas necessidades energéticas dos neurónios e pela capacidade dos astrócitos para sustentar essas necessidades, fundamentalmente pela glicólise anaeróbica. Para além de trocas de lactato e de outros intermediários do metabolismo energético, existe um ciclo de trocas de neurotransmissores excitatórios e dos seus metabolitos entre os astrócitos e os neurónios. Em particular, muito do glutamato libertado pelos neurónios glutamatérgicos é activamente importado pelo co-transportador Na^+ -glutamato para os astrócitos próximos das fendas sinápticas. A captação de glutamato pelos astrócitos é então dependente do gradiente de Na^+ transmembranar sustentado pela bomba de Na^+ dependente do ATP do plasmalema (143). O glutamato astrocitário é convertido em glutamina pela sintétase da glutamina (144). A glutamina é então exportada dos astrócitos para os neurónios onde entra na mitocôndria, sendo convertida a glutamato por acção da glutamínase. O glutamato mitocondrial pode então ser convertido até α -cetogluturato e metabolizado pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou pode ser transportado até ao citosol, onde fica disponível para incorporação nas vesículas sinápticas. A perturbação das funções da mitocôndria pelo traumatismo afecta as relações metabólicas entre astrócitos e neurónios de várias formas. Assim, o fornecimento aos neurónios do lactato produzido nos astrócitos depende da forma como as mitocôndrias dos astrócitos lidam com o piruvato. O desacoplamento entre a cadeia

transportadora de electrões e a síntese de ATP nas mitocôndrias dos astrócitos aumentaria o fluxo do piruvato com origem glicolítica para o metabolismo aeróbico. Esta alteração na utilização do piruvato pode diminuir o nível de lactato disponível para exportação aos neurónios vizinhos. Numa fase precoce após o traumatismo cerebral, a redução do metabolismo neuronal do lactato pode ser particularmente importante, uma vez que já se demonstrou que o lactato formado nos astrócitos é um substrato metabólico crítico para os neurónios em situações de isquemia e hipoxia (145, 146). Por outro lado, uma vez que os astrócitos obtêm uma fracção muito significativa das suas necessidades energéticas a partir da fosforilação oxidativa (147), o desacoplamento das mitocôndrias astrocitárias aumenta a síntese de ATP por via glicolítica, com o conseqüente aumento da produção de lactato. Apesar deste aumento da síntese de lactato contribuir para a satisfação das necessidades metabólicas neuronais, a produção excessiva pode provocar acidose tecidular e lesão celular após prolongada exposição a um meio ácido (148). O ciclo metabólico dos neurotransmissores como o glutamato pode também ser perturbado por alterações mitocondriais. Quebras no metabolismo energético mitocondrial nos astrócitos podem perturbar a remoção do glutamato da fenda sináptica promovendo assim a neurotoxicidade deste neurotransmissor. Perturbações do metabolismo mitocondrial neuronal podem ter impacto nos níveis de vários neurotransmissores como o glutamato, aspartato e acetilcolina, uma vez que estes são sintetizados ou metabolizados até intermediários metabólicos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (149).

Vários estudos já demonstraram que no compartimento entre a membrana interna e a membrana externa da mitocôndria existem várias proteínas

potencialmente pró-apoptóticas. Estas proteínas incluem o citocromo *c*, várias proteases como a caspase 9 e o factor indutor da apoptose. A libertação destas proteínas para o citosol pode resultar na activação da cascata das proteases de morte celular (caspases), produzindo os sinais moleculares e morfológicos típicos da apoptose (150). A libertação e redistribuição do citocromo *c* após o TCE parecem desempenhar um papel importante no traumatismo axonal e neuronal (44, 151).

Nos neurónios, a manutenção da homeostasia mitocondrial assume um carácter crítico dada a quase total dependência destas células do ATP originado naqueles organelos (152-154). A disfunção mitocondrial tem sido descrita por vários autores em múltiplos modelos de lesão cerebral traumática (68, 155, 156). O TCE é a causa de múltiplas patologias axonais que, no extremo, podem resultar na axotomia dos axónios lesados. No TCE grave, o axolema sofre perturbação focal, o que possibilita a entrada de Ca^{2+} e o início de processos pró-axotomia. As mitocôndrias podem actuar como sumidouros de Ca^{2+} nos locais em que o axolema está danificado, de forma a preservar as baixas concentrações citoplasmáticas deste ião. Contudo, esta sobrecarga de Ca^{2+} intramitocondrial aumenta a produção de espécies reactivas de oxigénio, inibe a síntese de ATP, liberta o citocromo *c* e pode causar edema osmótico coloidal pela abertura de um poro de transição de permeabilidade (102, 154). A teoria quimiosmótica baseia-se no facto da membrana interna da mitocôndria ser impermeável a solutos que não disponham de transportadores específicos. A abertura do poro de transição de permeabilidade provoca o colapso do potencial de membrana, desacoplando a cadeia transportadora de electrões da síntese de ATP. Recorrendo ao modelo de traumatismo usado nesta

dissertação, outros autores observaram que a depleção de ATP e de *N*-acetilaspártato aumentava a gravidade do TCE, o que sugeria que a actividade mitocondrial era afectada negativamente após o traumatismo (157). O edema mitocondrial resultante da abertura do poro de transição de permeabilidade pode também libertar proteínas pró-apoptóticas (158). Como já atrás se descreveu, o edema mitocondrial é um marcador de alterações da actividade destes organelos. No nosso trabalho pudemos verificar que o TCE aumentava o tamanho médio das mitocôndrias 24 horas após o traumatismo e que o tratamento com GAD e amilorido evitava esta manifestação. Com base nos dados acima expostos, acreditamos que tal ocorreu pela redução no desequilíbrio iónico intracelular pós-TCE.

Perturbações do transporte axonal e acumulação de organelos no TCE

O transporte selectivo e espacialmente controlado dos organelos no axónio desempenha um importante papel no estabelecimento e manutenção da estrutura, função e actividade bioquímica axonal. Pensa-se que a maior parte do transporte de longa distância de organelos ocorre com recurso ao movimento de proteínas motoras ligadas aos microtúbulos, como as cinesinas e as dineínas citoplasmáticas (159). A lesão traumática cerebral provoca alterações no citoesqueleto dos axónios. De facto, existem dados que apoiam a hipótese de que a lesão axonal traumática envolve danos iniciais no axolema, perda do equilíbrio iónico e activação de proteases de cisteína, directamente pela entrada de Ca^{2+} e indirectamente, após a falência mitocondrial, pela libertação de citocromo *c*. Estes processos proteolíticos levam à degradação de componentes necessários ao transporte axonal (por ex.: por acção da calpaína)

o que leva à acumulação de organelos, edema axonal e finalmente axotomia (160, 161). Dados obtidos com culturas de neurónios do hipocampo mostram que as mitocôndrias nos axónios e dendrites apresentam grande mobilidade e que estes movimentos são baseados na estrutura microtubular (159, 162, 163), no entanto algum movimento pode ocorrer ao longo de filamentos de actina (162). Nestas culturas de neurónios de hipocampo, também se demonstrou que em qualquer momento, um terço de todas as mitocôndrias está em movimento; destas cerca de 70 % tinham movimento anterógrado, enquanto que as restantes apresentavam movimento retrógrado. As mitocôndrias nos axónios têm maior probabilidade de se deslocarem a maior velocidade e a distâncias mais longas do que nas dendrites (163).

Ponderando sobre todos estes dados parece plausível que a maior concentração e tamanho das mitocôndrias observadas após o TCE nas nossas experiências podem resultar, pelo menos parcialmente, da perturbação da homeostasia iónica intracelular, assim como das alterações que ocorrem no citoesqueleto após o trauma. O maior número de peroxissomas por fotografia observado após o TCE poderá ser explicado pelo colapso do citoesqueleto que impede o normal transporte axonal, levando ao acumular destes organelos nas zonas danificadas. A ausência de edema mitocondrial, assim como a clara diminuição do número de peroxissomas por fotografia após o TCE nos animais tratados com GAD e amilorido, parece sugerir que estes fármacos evitaram estas manifestações de lesão secundária ao traumatismo, provavelmente por minorarem o desequilíbrio iónico intracelular. Como já aqui se referiu, não houve diminuição no número de axónios com pelo menos uma mitocôndria nos animais tratados após o TCE e não é possível concluir deste resultado se

ocorreu, ou não, diminuição do número total de mitocôndrias. Contudo, a menor coloração dos feixes axonais pelo TTC e o menor número de peroxissomas por fotografia parecem apoiar a hipótese da diminuição do número total de organelos nos axónios.

Nos axónios e dendrites o transporte e distribuição de organelos parecem ser influenciados pelas diferentes necessidades metabólicas locais dentro da célula neuronal. É sabido que há deslocação e acumulação de mitocôndrias nos cones de crescimento axonal activos, uma vez que essas zonas provavelmente consomem muito ATP e que, nos cones de crescimento inactivos, ocorre o processo inverso (164). Podemos então especular que a manutenção do número de mitocôndrias com pelo menos um axónio nos animais tratados após o TCE resulta de maiores necessidades energéticas nesses locais; a ausência de edema mitocondrial sugere que estas mitocôndrias estariam funcionais e portanto aparentemente capazes de produzir ATP.

Stresse oxidativo no TCE

O stresse oxidativo consiste num desequilíbrio entre a formação e a degradação de espécies reactivas de oxigénio. Este desequilíbrio resulta no aumento da concentração intracelular destes compostos, tendo como consequência danos oxidativos. O stresse oxidativo está envolvido em inúmeras situações patológicas no Homem e tem sido associado à lesão secundária ao traumatismo e/ou isquemia cerebrais (165, 166).

Nas células dos mamíferos formam-se continuamente peróxidos. Sendo o ião superóxido formado como “subproduto” da cadeia respiratória mitocondrial. Este ião é rapidamente convertido em peróxido de hidrogénio e oxigénio pela dismutase do superóxido (167). O peróxido de hidrogénio é também sintetizado

por muitas outras enzimas como a oxídase da glicose e a oxídase de monoaminas e deve ser rapidamente degradado de forma a evitar danos oxidativos (168). Quando presente em concentrações fisiológicas, da ordem dos micromolar, o H_2O_2 não é particularmente lesivo dos tecidos biológicos. Pensa-se que o efeito citotóxico do H_2O_2 passa pela formação de radicais OH^\bullet via reacções de Fenton catalizadas pelo ferro ou cobre, causando danos no ADN, proteínas e lípidos de membrana (169). De forma a evitar a reacção de Fenton, o nível das concentrações intracelulares de H_2O_2 e Fe^{2+} deve ser mantido baixo e tal só é possível através de uma eficiente e contínua remoção do peróxido e do armazenamento do ferro na ferritina (57). O cérebro é mais susceptível aos danos oxidativos do que outros órgãos. As razões dessa maior susceptibilidade resultam do seu conteúdo em ácidos gordos facilmente peroxidáveis, do elevado consumo de oxigénio e da relativa escassez de protecção antioxidante enzimática (57, 170). A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular do ião superóxido. Várias enzimas constituem a primeira linha de defesa contra as espécies reactivas de oxigénio formadas a nível intracelular. A dismútase do superóxido catalisa a dismutação dos radicais O_2^- , formando H_2O_2 . A actividade desta enzima é uma das mais importantes defesas contra os radicais O_2^- (167). A actividade da dismútase do superóxido requer a acção concertada com duas outras enzimas: a peroxidase da glutathiona e a catálase, uma vez que estas são as únicas enzimas que degradam hidroperóxidos (58). Já se demonstrou em modelos animais que a importância dos danos provocados pelos radicais de oxigénio é maior imediatamente após o trauma. O tratamento com dismútase do superóxido e catálase evitou a perda de reactividade arteriolar que ocorre imediatamente

após o TCE num modelo de lesão cerebral por percussão com fluido no Gato (171). Adicionalmente, a administração de dismutase do superóxido melhorou a perfusão cerebral em ratos sujeitos a lesão cerebral por percussão com fluido (172).

A catalase é uma enzima peroxissomal cuja actividade é controlada pela difusão dos seus substratos a partir do citosol, sendo particularmente eficaz na remoção de altas concentrações de H_2O_2 . A expressão da catalase já foi demonstrada em todos os tipos de células cerebrais tanto *in vitro* (62) como *in vivo* (63, 64). Este facto sugere que a catalase tem uma importante função neste órgão, apesar da sua actividade ser duas ordens de grandeza menor do que no rim ou fígado (61). Num conjunto inicial de experiências avaliámos a actividade da catalase 24 horas após o traumatismo. O TCE provocou um marcado aumento de actividade da enzima no cérebro, aumento este que foi evitado pela administração de GAD ou amilorido. A administração destes fármacos a animais controlo não teve efeito significativo na actividade da enzima. Posteriormente verificámos que estes valores não reflectiam a actividade da enzima no tecido cerebral. A variação da actividade da catalase observada nestes animais estava provavelmente relacionada com a hiperemia cerebral produzida pelo TCE. Como estes animais não tinham sido perfundidos com soro fisiológico, é provável que uma grande quantidade de catalase eritrocitária estivesse presente nos vasos cerebrais. Como a actividade da catalase no sangue é várias ordens de grandeza superior à do tecido cerebral, a hiperemia pode ter um efeito marcado na actividade total no cérebro não perfundido. O aumento do fluxo sanguíneo cerebral após o TCE já foi descrito em modelos experimentais e em quadros clínicos (173, 174). Foi interessante

verificar que quando não se efectuava a perfusão dos tecidos, a administração de GAD ou de amilorido evitava o aumento da actividade da catalase após o TCE. Posteriormente, para avaliar a actividade da catalase, todas as experiências realizadas incluíram a perfusão com soro fisiológico previamente à colheita de tecido cerebral. O tecido cerebral foi colhido 1, 6, 12 e 24 horas após o traumatismo. Os resultados mostraram um aumento significativo da actividade da catalase até 6 horas após o TCE, uma redução até valores similares aos controlos pelas 12 horas, sendo às 24 horas significativamente menor que nos controlos. O tratamento com GAD ou amilorido não interferiu com o aumento da actividade da catalase às 6 horas pós-TCE. Contudo, ambos os fármacos foram capazes de evitar a perda de actividade observada 24 horas após o TCE. Uma possível explicação para esta perda de actividade reside no facto de níveis moderadamente elevados de peróxidos poderem levar à autoinactivação reversível da catalase; tal ocorre pela conversão do centro activo do complexo I da enzima nos complexos inactivos II ou III como já foi descrito em astrócitos em cultura (175). Em altas concentrações o H_2O_2 parece actuar como um "substrato suicida" inibindo irreversivelmente a catalase (176). O ião O_2^- pode inibir a catalase e esta inibição pode ser evitada e mesmo revertida pela dismutase do superóxido (177). Como nas nossas experiências o TCE não afectou a actividade da dismutase do superóxido, parece provável que a inibição da catalase tenha sido provocada essencialmente pelo H_2O_2 . O que nos parece claro é que sem realizar a perfusão salina prévia à colheita do tecido não nos seria possível distinguir entre a actividade da catalase cerebral e sanguínea. Uma vez que nenhum dos fármacos alterou a actividade da enzima nos animais controlo, parece possível concluir que a administração de

GAD ou de amilorido evitou a hiperemia observada após o TCE. Após o TCE, o stresse oxidativo não se limita ao sistema nervoso central. Num modelo de TCE fechado já se demonstrou em extractos aquosos e lipídicos de cérebro, coração, pulmão, rim e fígado a redução dos níveis de antioxidantes de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico, ácido úrico, α -tocoferol e β -caroteno. Apesar da lesão inicial se localizar no cérebro, todo o organismo evidenciou sinais de stresse oxidativo nas 24 horas seguintes ao traumatismo (54). O aumento da catálase 24 horas após o TCE observado no nosso trabalho não se limitou ao tecido cerebral, uma vez que esta enzima exibiu aumentos significativos de actividade no fígado e nos eritrócitos. O comportamento da catálase hepática 24 horas após o TCE foi similar ao da catálase cerebral, uma vez que o tratamento com GAD ou amilorido evitavam a diminuição da actividade da enzima. No caso da catálase eritrocitária, a administração de GAD aos animais controlo sem TCE provocou uma significativa diminuição da actividade da enzima em comparação com os controlos não tratados. A administração de GAD após o TCE não agravou a diminuição na actividade da catálase observada nos TCE não tratados e, se a comparação for feita com os controlos tratados com GAD, não há diferenças entre os grupos. Sabemos que o gadolínio pode alterar a permeabilidade da membrana do eritrócito (178). Outros autores defendem que um meio de contraste contendo gadolínio, o Gd-DOTA, altera a viscosidade sanguínea, diminui o volume eritrocitário médio e diminui a agregação plaquetária (179). Podemos apenas especular que os efeitos acima citados têm algum papel no comportamento da catálase eritrocitária após a administração de GAD.

Além da catálase, outra enzima, a peroxidase da glutathione, está envolvida na degradação do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos. Esta enzima usa a glutathione como dadora de equivalentes redutores (180). A actividade da peroxidase da glutathione já foi verificada no tecido cerebral (181). Enquanto que a catálase se encontra nos peroxissomas, a peroxidase da glutathione encontra-se fundamentalmente no citosol e só 10 % na matriz mitocondrial (168). A cooperação entre estas duas enzimas parece ser essencial para evitar a toxicidade do H_2O_2 . A maior afinidade da peroxidase da glutathione pelo H_2O_2 permite operar melhor quando há baixas concentrações do substrato e a menor afinidade da catálase, assim como a sua localização nos peroxissomas, permite lidar melhor com altas concentrações do substrato (168). Em oligodendrócitos já se observou que a actividade da catálase é afectada pela pré-exposição ao H_2O_2 , o que não se verificou com a peroxidase da glutathione. A peroxidase da glutathione parece ter menor sensibilidade à inactivação pelo H_2O_2 do que a catálase. A cooperação entre estas duas enzimas é revelada pelo facto da actividade da peroxidase da glutathione ser essencial na manutenção de concentrações de H_2O_2 abaixo do nível em que ocorre a inactivação da catálase; por outro lado, a participação da catálase na degradação do H_2O_2 limita a depleção da glutathione intracelular, o que por si só comprometeria a acção da peroxidase da glutathione (182). Nos neurónios, a peroxidase da glutathione é menos eficiente na degradação do H_2O_2 do que a catálase, o que torna estas células mais vulneráveis ao stresse oxidativo do que os astrócitos (180). Em modelos de traumatismo de percussão com fluido ou de percussão pneumática, vários autores verificaram aumentos de actividade da peroxidase da glutathione cerebral 24 horas após o traumatismo

(183, 184). Um desses trabalhos refere inclusive um aumento da actividade da catalase 24 horas após o TCE (183). Como na metodologia destes trabalhos não está mencionada a realização de uma perfusão salina antes da remoção do tecido cerebral, pensamos, com base nos nossos resultados da catalase, que os aumentos de actividade descritos podem ser atribuídos, pelo menos em parte, à hiperemia pós-TCE. Nas nossas experiências a actividade da peroxidase da glutathione não foi afectada pelo TCE no tecido cerebral, hepático e no sangue. A administração de amilorido a animais controlo aumentou significativamente a actividade da peroxidase da glutathione cerebral e da dismutase do superóxido cerebral e hepática por razões que desconhecemos. Contudo podemos especular que os efeitos inibitórios do amilorido sobre o trocador Na^+/H^+ e as prováveis alterações do pH intracelular daí decorrentes (185-187) podem ser, pelo menos em parte, responsáveis por estes efeitos.

A dismutase do superóxido catalisa a conversão do O_2^- ou do ONOO^- (peroxinitrito), formando H_2O_2 ou NO_2^+ . Nos mamíferos existem três isoformas da enzima: a forma citosólica Cu-Zn-dismutase do superóxido, a forma mitocondrial Mn-dismutase do superóxido e a forma extracelular (188). A supressão do gene que codifica a dismutase do superóxido citosólica em ratinhos não provocou aumento na morte de neurónios motores em condições normais de laboratório. No entanto estes animais exibiam lesão neuronal grave e formação de edema após isquemia cerebral focal (189), assim como aumento da morte celular após lesão axonal (190). Estes dados mostram a importância desta enzima no controlo do stresse oxidativo em situações de agressão traumática e/ou isquémica ao sistema nervoso central. Os nossos resultados mostram que o TCE não alterou significativamente a actividade desta enzima

no tecido cerebral. No entanto, a nível hepático e nos eritrócitos o TCE provocou uma descida significativa da actividade da dismutase do superóxido. O tratamento com GAD evitou a perda de actividade da enzima após o TCE tanto a nível hepático como nos eritrócitos. O tratamento com amilorido aumentou significativamente a actividade da dismutase do superóxido no fígado dos animais controlo mas, no entanto, não evitou a perda de actividade da enzima observada após o TCE neste órgão. Nos eritrócitos o tratamento com amilorido após o TCE preservou a actividade da dismutase do superóxido. Paradoxalmente, no que toca à actividade da dismutase do superóxido, só a nível periférico é que observámos alterações e quase todas essas alterações foram evitadas pelos fármacos administrados. Aparentemente, o controlo precoce dos mecanismos de lesão secundária ao TCE tem influência no stresse oxidativo no organismo a nível periférico.

Peroxidação lipídica no TCE

Como já foi referido neste texto, de entre as razões que tornam o tecido cerebral mais susceptível a reacções de peroxidação lipídica após o TCE destacam-se: o elevado conteúdo no tecido cerebral de ácidos gordos com cadeias altamente polinsaturadas, a libertação de iões ferro (e cobre) e o elevado consumo cerebral de O_2 (47). Vários autores já demonstraram, tanto em modelos experimentais como na prática clínica, a ocorrência de peroxidação lipídica após o TCE (55, 67, 191-193). Em doentes com TCE já se descreveu que os níveis de peroxidação lipídica secundária ao traumatismo estão directamente relacionados com a severidade do mesmo. Pensa-se até que a determinação nas 24 horas após o TCE dos níveis de malonildialdeído

no fluido cefaloraquidiano poderá ter valor prognóstico (55). No modelo usado nesta dissertação já se demonstrou aumento da peroxidação lipídica devido à maior produção de espécies reactivas de oxigénio; este aumento foi inicialmente observado uma hora após o TCE, sendo ainda observável 24 horas após o traumatismo (194). Outros autores, utilizando a variante de traumatismo moderado do método de Marmarou (peso de 450 g solto a 1 m de altura), também observaram alterações bioquímicas compatíveis com o aumento da peroxidação lipídica (68). Os resultados obtidos no nosso trabalho demonstram que o TCE aumenta a peroxidação lipídica no tecido cerebral. Também observámos que a administração de GAD ou amilorido 30 minutos após o TCE reduzia significativamente a peroxidação lipídica em comparação com os animais traumatizados não tratados. Estes resultados foram verificados com recurso a dois métodos, a determinação do malonildialdeído pelo método das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico e pelo *kit* de determinação da presença de hidroperóxidos lipídicos. A determinação do malonildialdeído pelo método das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um indicador indirecto de peroxidação lipídica. A razão pela qual se utilizou um segundo método de avaliação da peroxidação lipídica resulta do facto do método das TBARS ser frequentemente criticado pelo facto do ácido tiobarbitúrico também reagir com outros compostos celulares não lipídicos (195). Os resultados obtidos com os dois métodos foram sobreponíveis. A peroxidação lipídica nos astrócitos após TCE ou stresse oxidativo resulta na produção de isoprostanos; estes compostos têm actividade biológica (por exemplo, são potentes vasoconstritores), pelo que a redução da peroxidação

lipídica pode ser uma importante via de controlo dos mecanismos de lesão secundária (70).

Nos animais controlo sem traumatismo, a administração de amilorido não alterou a produção de TBARS em comparação com os controlos não traumatizados sem tratamento. No entanto, a administração de GAD diminuiu significativamente a produção de TBARS nos animais controlo sem traumatismo. Uma possível explicação para esta observação pode ser obtida em trabalhos que demonstram que a administração de cloreto de gadolínio diminui significativamente a produção de malonildialdeído a nível hepático. Este efeito foi atribuído ao facto do $GdCl_3$ ser um inibidor das células de Kupffer (196-198). Quando activadas, estas células produzem mediadores tóxicos causadores de peroxidação lipídica (198). No sistema nervoso central, a microglia é considerada como o conjunto dos macrófagos residentes que em condições de normalidade revelam uma actividade fagocitótica ou endocitótica limitada (199). No entanto, é para nós plausível que a inibição dessa actividade basal justifique a menor produção de TBARS nos controlos tratados com GAD. O TCE desencadeia respostas imunes e inflamatórias que incluem a activação da microglia e o recrutamento de fagócitos da circulação. Pensa-se que esta resposta imune/inflamatória seja um mecanismo de reparação do tecido lesado. Contudo, uma resposta excessiva pode resultar em danos adicionais, como a produção de espécies reactivas de oxigénio e de azoto pelos fagócitos (200). Sabendo que o Gd^{3+} inibe os macrófagos hepáticos, reduzindo a peroxidação lipídica e outros marcadores de stresse oxidativo, podemos especular que ocorra um fenómeno similar com os macrófagos cerebrais. Isto explicaria a razão dos valores de TBARS e de hidroperóxidos lipídicos

observados nos animais traumatizados tratados com GAD se apresentarem tendencialmente mais baixos do que aqueles tratados com amilorido (a diferença entre estes dois grupos não é, no entanto, estatisticamente significativa).

Testes de avaliação de défice neurológico

A lesão axonal difusa está relacionada com défices sensoriomotores. No modelo de TCE usado neste trabalho já foi descrita a presença generalizada de axónios em degeneração no corpo caloso, corpo estriado e tálamo, assim como na matéria branca do córtex sensoriomotor e cerebelo; todas estas áreas estão envolvidas na aprendizagem e controlo motor (201).

A tonicidade muscular é o estado de contracção parcial característico do músculo esquelético normal. Esta contracção é sustentada pela contínua estimulação de impulsos motores com origem reflexa, contribuindo para a manutenção da postura corporal. A redução da tonicidade muscular após o TCE já foi descrita em vários modelos de traumatismo, incluindo o utilizado neste trabalho (10, 202, 203). No caso particular do modelo usado nesta dissertação, imediatamente após o TCE ocorrem convulsões generalizadas durante aproximadamente 15 a 30 segundos (10), seguindo-se uma situação de perda da tonicidade muscular que, como os nossos resultados comprovam, ainda se verifica 24 horas após o TCE. De todos os testes de avaliação do défice neurológico realizados neste estudo, só o teste de tonicidade muscular e o *rotarod* mostraram diferenças significativas entre os grupos controlo e TCE. O tratamento com GAD ou amilorido evitou a perda de tonicidade muscular, o que nos permite pensar que esta terapêutica preservou a actividade reflexa que

sustenta esta contracção muscular. No caso do *rotarod*, o tratamento com amilorido mostra que a perda de desempenho dos animais tratados não é estatisticamente diferente dos controlos tratados e não tratados, o que mostra que este tratamento protegeu a função motora. A impossibilidade de executar este teste nos animais tratados com GAD, uma vez que a forma de administração deste fármaco limita o normal desempenho dos animais no teste, condicionou a possibilidade de observar alterações do controlo motor com este protocolo terapêutico. A escolha deste teste para o nosso estudo resultou do facto do teste do *rotarod* ser considerado como um dos índices mais eficientes e sensíveis na avaliação de limitações na actividade motora produzidas pelo TCE (86).

Os anestésicos como neuroprotectores

A cetamina é um antagonista não competitivo dos receptores do N-metil-D-aspartato (NMDA). Por essa razão é considerada por vários autores como um agente neuroprotector em situações de isquemia e traumatismo (204-207). Adicionalmente, já se demonstrou que a cetamina pode atenuar a subida dos níveis de cálcio cerebral após o TCE (204). Como já foi aqui referido, a subida de cálcio intracelular e a estimulação de receptores do glutamato, nomeadamente dos receptores NMDA, são elementos chave no processo de lesão secundária ao TCE. Como tal, é possível argumentar que o uso deste anestésico neste estudo poderá ter atenuado os sinais de lesão secundária observados. Mais ainda, poder-se-á argumentar que o efeito neuroprotector dos bloqueadores dos canais iónicos mecanosensíveis poderá só ser evidente em associação com a cetamina. A escolha de um anestésico que interferisse o

menos possível no estudo não ficou facilitada, pois não existe no nosso laboratório equipamento de anestesia gasosa dos animais. O anestésico tradicionalmente usado no nosso laboratório é o pentobarbital. Contudo este fármaco causa depressão respiratória moderada e hipotensão no Rato, o que não acontece com a associação cetamina-diazepam, que por essa razão interfere menos com a ventilação e perfusão dos animais (208). No modelo de TCE usado neste estudo imediatamente após o trauma ocorre apneia, seguida de uma redução de 20 % na taxa respiratória nos trinta minutos seguintes (10). O uso de um fármaco que causa depressão respiratória neste modelo de trauma aumentaria a mortalidade além do que seria tolerável. A mistura anestésica utilizada (cetamina-diazepam-atropina) manteve a mortalidade dentro dos valores referidos pelos autores do modelo de TCE.

Conclusões

Os nossos resultados mostram que a administração de bloqueadores dos canais iónicos mecanossensíveis após o TCE evitam as modificações axonais responsáveis pela alteração da coloração pelo TTC, preservam o diâmetro mitocondrial, reduzem a acumulação de peroxissomas nos axónios, parecem evitar a hiperemia, preservam a actividade da catálase cerebral e hepática, preservam a actividade da dismutase do superóxido sanguínea e hepática (neste último caso só com o GAD), diminuem a peroxidação lipídica, mantêm a tonicidade muscular e, no caso do amilorido, preservam a actividade motora no teste do *rotarod*.

Todos estes dados sugerem o envolvimento dos canais iónicos mecanossensíveis na génese da perturbação iónica que leva ao stresse

Discussão

oxidativo e a outros processos de lesão secundária após o TCE. Na eventualidade de todas as alterações verificadas com estes fármacos representarem de facto efeitos benéficos no TCE, os nossos resultados mostram que esta abordagem farmacológica poderá ser útil numa janela temporal de pelo menos trinta minutos após o TCE.

Bibliografia

1. Kraus J, MacArthur D, Silverman T, *et al.* Epidemiology of brain injury. In: Narayan R, Wilberger J, Povlishock J, editors. Neurotrauma. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 13-30.
2. Valadka A, Narayan R. Injury to the cranium. In: Feliciano D, Moore E, Mattox K, editors. Trauma. Norwalk: Appleton & Lange; 1996. p. 267-278.
3. Jennett B. Epidemiology of head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(4):362-9.
4. Klauber MR, Barrett-Connor E, Marshall LF, Bowers SA. The epidemiology of head injury: a prospective study of an entire community-San Diego County, California, 1978. *Am J Epidemiol* 1981;113(5):500-9.
5. Santos ME, De Sousa L, Castro-Caldas A. [Epidemiology of craniocerebral trauma in Portugal]. *Acta Med Port* 2003;16(2):71-6.
6. Reinert MM, Bullock R. Clinical trials in head injury. *Neurol Res* 1999;21(4):330-8.
7. Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, McIntosh TK. Workshop on animal models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11(6):723-32.
8. McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee VM, *et al.* The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(4):251-67.
9. Gennarelli TA. Animate models of human head injury. *J Neurotrauma* 1994;11(4):357-68.

10. 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;80(2):291-300.
11. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 1994;80(2):301-13.
12. Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 1989;15(1):49-59.
13. Graham DI, Adams JH, Nicoll JA, Maxwell WL, Gennarelli TA. The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. *Brain Pathol* 1995;5(4):397-406.
14. Regner A, Alves LB, Chemale I, Costa MS, Friedman G, Achaval M, et al. Neurochemical characterization of traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 2001;18(8):783-92.
15. Vagnozzi R, Marmarou A, Tavazzi B, Signoretti S, Di Pierro D, del Bolgia F, et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 1999;16(10):903-13.
16. Povlishock JT, Buki A, Koizumi H, Stone J, Okonkwo DO. Initiating mechanisms involved in the pathobiology of traumatically induced axonal injury and interventions targeted at blunting their progression. *Acta Neurochir Suppl* 1999;73:15-20.
17. Adams JH. Diffuse axonal injury in non-missile head injury. *Injury* 1982;13(5):444-5.

18. Povlishock JT, Christman CW. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 1995;12(4):555-64.
19. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 1982;12(6):564-74.
20. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *J Neurotrauma* 1997;14(7):419-40.
21. Niess C, Grauel U, Toennes SW, Bratzke H. Incidence of axonal injury in human brain tissue. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104(1):79-84.
22. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986;17(6):1304-8.
23. Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, et al. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984;65(2):150-7.
24. Bose B, Jones SC, Lorig R, Friel HT, Weinstein M, Little JR. Evolving focal cerebral ischemia in cats: spatial correlation of nuclear magnetic resonance imaging, cerebral blood flow, tetrazolium staining, and histopathology. *Stroke* 1988;19(1):28-37.
25. Heinel LA, Rubin S, Rosenwasser RH, Vasthare US, Tuma RF. Leukocyte involvement in cerebral infarct generation after ischemia and reperfusion. *Brain Res Bull* 1994;34(2):137-41.

26. Perri BR, Smith DH, Murai H, Sinson G, Saatman KE, Raghupathi R, et al. Metabolic quantification of lesion volume following experimental traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 1997;14(1):15-22.
27. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991;39(3):253-62.
28. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, et al. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 1987;67(1):110-9.
29. Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967;26(1):1-14.
30. Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res* 1989;482(2):271-82.
31. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* 1988;5(1):1-15.
32. Gotoh H, Takahashi A. Mechanical stimuli induce intracellular calcium response in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience* 1999;92(4):1323-9.
33. Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Neurosci* 2001;21(6):1923-30.
34. Chaban VV, McRoberts JA, Ennes HS, Mayer EA. Nitric oxide synthase inhibitors enhance mechanosensitive Ca(2+) influx in cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2001;903(1-2):74-85.

35. Fujisaki T, Kudoh M, Shibuki K. Acute neural damage in the rat neocortex in vitro induced by a combination of anoxia and mechanical stress. *Neuroscience* 1998;84(2):591-601.
36. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 12):2449-60.
37. Hamill OP, McBride DW, Jr. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev* 1996;48(2):231-52.
38. Gschossmann JM, Chaban VV, McRoberts JA, Raybould HE, Young SH, Ennes HS, et al. Mechanical activation of dorsal root ganglion cells in vitro: comparison with capsaicin and modulation by kappa-opioids. *Brain Res* 2000;856(1-2):101-10.
39. Sharma RV, Chapleau MW, Hajduczuk G, Wachtel RE, Waite LJ, Bhalla RC, et al. Mechanical stimulation increases intracellular calcium concentration in nodose sensory neurons. *Neuroscience* 1995;66(2):433-41.
40. Stys PK. White matter injury mechanisms. *Curr Mol Med* 2004;4(2):113-30.
41. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* 2003;126(Pt 3):515-30.
42. Vaz R, Sarmiento A, Borges N, Cruz C, Azevedo I. Effect of mechanogated membrane ion channel blockers on experimental traumatic brain oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 1998;140(4):371-4; discussion 375.
43. Borges N, Cerejo A, Santos A, Sarmiento A, Azevedo I. Changes in rat cerebral mitochondrial succinate dehydrogenase activity after brain trauma. *Int J Neurosci* 2004;114(2):217-27.

44. Buki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 2000;20(8):2825-34.
45. Fitzpatrick MO, Maxwell WL, Graham DI. The role of the axolemma in the initiation of traumatically induced axonal injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(3):285-7.
46. Christman CW, Grady MS, Walker SA, Holloway KL, Povlishock JT. Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *J Neurotrauma* 1994;11(2):173-86.
47. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals, other reactive species and disease. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition ed. Oxford: Oxford Scientific Publications; 2000. p. 617-783.
48. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 1989;244(4906):798-800.
49. Nilsson P, Hillered L, Ponten U, Ungerstedt U. Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10(5):631-7.
50. Obrenovitch TP, Urenjak J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J Neurotrauma* 1997;14(10):677-98.
51. Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 1993;61(6):2015-24.
52. Siesjo BK, Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996;13(3):247-68.

53. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17(10):871-90.
54. Shohami E, Gati I, Beit-Yannai E, Trembovler V, Kohen R. Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile. *J Neurotrauma* 1999;16(5):365-76.
55. Kasprzak HA, Wozniak A, Drewa G, Wozniak B. Enhanced lipid peroxidation processes in patients after brain contusion. *J Neurotrauma* 2001;18(8):793-7.
56. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1986;3(4):257-63.
57. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005;79(1-2):157-65.
58. Islekel S, Islekel H, Guner G, Ozdamar N. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res Exp Med (Berl)* 1999;199(3):167-76.
59. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982;42(5):1955-61.
60. Sinet PM, Heikkila RE, Cohen G. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J Neurochem* 1980;34(6):1421-8.
61. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997;272(26):16644-51.

62. Hirrlinger J, Resch A, Gutterer JM, Dringen R. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* 2002;82(3):635-44.
63. Schad A, Fahimi HD, Volkl A, Baumgart E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). *J Histochem Cytochem* 2003;51(6):751-60.
64. Fouquet F, Zhou JM, Ralston E, Murray K, Troalen F, Magal E, et al. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis* 1997;3(4):271-85.
65. Dubenko AE. [The role of lipid peroxidation and the activity of energy metabolism enzymes in the pathogenesis of acute closed craniocerebral trauma]. *Vrach Delo* 1991(12):68-71.
66. Koc RK, Kurtsoy A, Pasaoglu H, Karakucuk EI, Oktem IS, Meral M. Lipid peroxidation and oedema in experimental brain injury: comparison of treatment with methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E. *Res Exp Med (Berl)* 1999;199(1):21-8.
67. Ozsuer H, Gorgulu A, Kiris T, Cobanoglu S. The effects of memantine on lipid peroxidation following closed-head trauma in rats. *Neurosurg Rev* 2005;28(2):143-7.
68. Vagnozzi R, Marmarou A, Tavazzi B, Signoretti S, Di Pierro D, del Bolgia F, et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats

leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 1999;16(10):903-13.

69. White BC, Krause GS. Brain injury and repair mechanisms: the potential for pharmacologic therapy in closed-head trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22(6):970-9.

70. Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Ellis EF. Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma* 2000;17(5):415-20.

71. Horakova L, Ondrejickova O, Bachrata K, Vajdova M. Preventive effect of several antioxidants after oxidative stress on rat brain homogenates. *Gen Physiol Biophys* 2000;19(2):195-205.

72. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. *Human physiology the mechanisms of body function*. 8th ed. Boston: McGraw-Hill; 2001.

73. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28(4):365-78.

74. O'Connor C, Heath DL, Cernak I, Nimmo AJ, Vink R. Effects of daily versus weekly testing and pre-training on the assessment of neurologic impairment following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003;20(10):985-93.

75. O'Connor CA, Cernak I, Vink R. Interaction between anesthesia, gender, and functional outcome task following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003;20(6):533-41.

76. Vink R, O'Connor CA, Nimmo AJ, Heath DL. Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 2003;336(1):41-4.
77. Karnovsky M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965;27:137a.
78. Azevedo I, Castro-Tavares J, Garrett J. Ultrastructural changes in blood vessels of perinephritic hypertensive dogs. *Blood Vessels* 1981;18(3):110-9.
79. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
80. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
81. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-69.
82. Dacie SJV, Lewis SM. Manual Techniques - Estimation of haemoglobin concentration (Hb). In: Bain BF, editor. *Practical Haematology*. 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995. p. 50-54.
83. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
84. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994;220(2):403-9.
85. White HS, Woodhead JH, Franklin MR, Swinyard EA, Wolf HH. Experimental selection, quantification and evaluation of antiepileptic drugs. In:

Levy R, Mattson R, Meldrum B, editors. Antiepileptic drugs. New York: Raven Press; 1989. p. 99-110.

86. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11(2):187-96.

87. Hays WL. Statistics. 4th ed. Fort Worth: Holt, Rinehart and Winston Inc.; 1988.

88. Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 1996;38(6):1176-95.

89. McLean AE, McLean E, Judah JD. Cellular necrosis in the liver induced and modified by drugs. *Int Rev Exp Pathol* 1965;4:127-57.

90. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 1979;206(4419):700-2.

91. Schlaepfer WW, Bunge RP. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol* 1973;59(2 Pt 1):456-70.

92. Jancso G, Karcsu S, Kiraly E, Szebeni A, Toth L, Bacsy E, et al. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res* 1984;295(2):211-6.

93. Limbrick DD, Jr., Sombati S, DeLorenzo RJ. Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintenance of glutamate-induced extended neuronal depolarization associated with hippocampal neuronal death. *Cell Calcium* 2003;33(2):69-81.

94. Garthwaite G, Garthwaite J. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci Lett* 1986;66(2):193-8.
95. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 1985;58(3):293-7.
96. Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 1993;13(5):2085-104.
97. Balentine JD. Spinal cord trauma: in search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988;47(2):77-92.
98. Balentine JD, Greene WB. Ultrastructural pathology of nerve fibers in calcium-induced myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984;43(5):500-10.
99. Siesjo BK. Cellular calcium metabolism, seizures, and ischemia. *Mayo Clin Proc* 1986;61(4):299-302.
100. Siesjo BK. Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol* 1986;25 Suppl 1:45-56.
101. Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, et al. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 2005;120(2):275-85.
102. Okonkwo DO, Povlishock JT. An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(4):443-51.
103. Kater SB, Mattson MP, Guthrie PB. Calcium-induced neuronal degeneration: a normal growth cone regulating signal gone awry. *Ann N Y Acad Sci* 1989;568:252-61.

104. Spitzer NC, Gu X, Olson E. Action potentials, calcium transients and the control of differentiation of excitable cells. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4(1):70-7.
105. Yuste R, Katz LC. Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 1991;6(3):333-44.
106. Marta CB, Davio C, Pasquini LA, Soto EF, Pasquini JM. Molecular mechanisms involved in the actions of apotransferrin upon the central nervous system: Role of the cytoskeleton and of second messengers. *J Neurosci Res* 2002;69(4):488-96.
107. Trifaro JM, Vitale ML. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 1993;16(11):466-72.
108. Delmas P, Coste B, Gamper N, Shapiro MS. Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron* 2005;47(2):179-82.
109. Wang X, Bao J, Zeng XM, Liu Z, Mei YA. Elevation of intracellular Ca²⁺ modulates A-currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 2005.
110. Macleod GT, Marin L, Charlton MP, Atwood HL. Synaptic vesicles: test for a role in presynaptic calcium regulation. *J Neurosci* 2004;24(10):2496-505.
111. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 2002;64:355-405.
112. Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Neurosci* 2001;21(6):1923-30.

113. Zhou F, Xiang Z, Feng WX, Zhen LX. Neuronal free Ca²⁺ and BBB permeability and ultrastructure in head injury with secondary insult. *J Clin Neurosci* 2001;8(6):561-3.
114. Caldwell RA, Clemo HF, Baumgarten CM. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):C619-21.
115. Hurwitz CG, Hu VY, Segal AS. A mechanogated nonselective cation channel in proximal tubule that is ATP sensitive. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(1):F93-F104.
116. Krasznai Z, Morisawa M, Krasznai ZT, Morisawa S, Inaba K, Bazsane ZK, et al. Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55(4):232-43.
117. Kumar A, Khandelwal N, Malya R, Reid MB, Boriek AM. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *Faseb J* 2004;18(1):102-13.
118. Ma AA, Ravi K, Bravo EM, Kappagoda CT. Effects of gadolinium chloride on slowly adapting and rapidly adapting receptors of the rabbit lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;141(2):125-35.
119. McBride TA, Stockert BW, Gorin FA, Carlsen RC. Stretch-activated ion channels contribute to membrane depolarization after eccentric contractions. *J Appl Physiol* 2000;88(1):91-101.
120. Nicolosi AC, Kwok CS, Bosnjak ZJ. Antagonists of stretch-activated ion channels restore contractile function in hamster dilated cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004;23(8):1003-7.

121. Viana F, de la Pena E, Pecson B, Schmidt RF, Belmonte C. Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 2001;13(4):722-34.
122. Yellowley CE, Hancox JC, Donahue HJ. Effects of cell swelling on intracellular calcium and membrane currents in bovine articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 2002;86(2):290-301.
123. Marunaka Y, Tohda H, Hagiwara N, Nakahari T. Antidiuretic hormone-responding nonselective cation channel in distal nephron epithelium (A6). *Am J Physiol* 1994;266(6 Pt 1):C1513-22.
124. Franz MR, Bode F. Mechano-electrical feedback underlying arrhythmias: the atrial fibrillation case. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;82(1-3):163-74.
125. Pereira DT, Nozaki PN, Menani JV, Colombari E, De Luca LA, Jr., Schoorlemmer GH. Effect of the gadolinium ion on body fluid regulation. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;76(2):275-83.
126. Spencer AJ, Wilson SA, Batchelor J, Reid A, Rees J, Harpur E. Gadolinium chloride toxicity in the rat. *Toxicol Pathol* 1997;25(3):245-55.
127. Laniado M, Weinmann HJ, Schorner W, Felix R, Speck U. First use of GdDTPA/dimeglumine in man. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984;16(2):157-65.
128. Barzo P, Marmarou A, Fatouros P, Corwin F, Dunbar JG. Acute blood-brain barrier changes in experimental closed head injury as measured by MRI and Gd-DTPA. *Acta Neurochir Suppl* 1997;70:243-6.
129. Sarka L, Burai L, Brucher E. The rates of the exchange reactions between $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ and the endogenous ions Cu^{2+} and Zn^{2+} : a kinetic

model for the prediction of the in vivo stability of [Gd(DTPA)]²⁻, used as a contrast agent in magnetic resonance imaging. *Chemistry* 2000;6(4):719-24.

130. Kuwatsuru R, Shames DM, Muhler A, Mintorovitch J, Vexler V, Mann JS, et al. Quantification of tissue plasma volume in the rat by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 1993;30(1):76-81.

131. LoPachin RM, Lehning EJ. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143(2):233-44.

132. Wrathall JR, Teng YD, Marriott R. Delayed antagonism of AMPA/kainate receptors reduces long-term functional deficits resulting from spinal cord trauma. *Exp Neurol* 1997;145(2 Pt 1):565-73.

133. Park CK, Mendelow AD, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Correlation of triphenyltetrazolium chloride perfusion staining with conventional neurohistology in the detection of early brain ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988;14(4):289-98.

134. Marinov M, Wassmann H, Natschev S. Effect of nimodipine in treatment of experimental focal cerebral ischaemia. *Neurol Res* 1991;13(2):77-83.

135. Mathews KS, McLaughlin DP, Ziabari LH, Toner CC, Street PC, Hisgrove E, et al. Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods* 2000;102(1):43-51.

136. Streit WJ. Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol* 2000;28(1):28-30.

137. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(3-4):463-71.

138. Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 2000;17(10):843-55.
139. Stavrovskaya IG, Kristal BS. The powerhouse takes control of the cell: is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med* 2005;38(6):687-97.
140. Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 1998;20(4-5):291-9.
141. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science* 1999;283(5401):496-7.
142. Fiskum G, Rosenthal RE, Vereczki V, Martin E, Hoffman GE, Chinopoulos C, et al. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36(4):347-52.
143. Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, et al. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 1997;17(3):932-40.
144. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 1999;57(4):417-28.
145. Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. *J Neurochem* 1997;69(1):423-6.
146. Schurr A, Payne RS, Tseng MT, Miller JJ, Rigor BM. The glucose paradox in cerebral ischemia. New insights. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:386-90.

147. Silver IA, Erecinska M. Energetic demands of the Na⁺/K⁺ ATPase in mammalian astrocytes. *Glia* 1997;21(1):35-45.
148. Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T, Li PA, Siesjo P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl* 1996;66:8-14.
149. Stone R, Stewart VC, Hurst RD, Clark JB, Heales SJ. Astrocyte nitric oxide causes neuronal mitochondrial damage, but antioxidant release limits neuronal cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:400-3.
150. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17(10):811-29.
151. Sullivan PG, Keller JN, Bussen WL, Scheff SW. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. *Brain Res* 2002;949(1-2):88-96.
152. Budd SL, Nicholls DG. Mitochondria in the life and death of neurons. *Essays Biochem* 1998;33:43-52.
153. Nicholls DG, Budd SL. Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *Biofactors* 1998;8(3-4):287-99.
154. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res* 2005;79(1-2):231-9.
155. Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem* 2001;79(6):1237-45.
156. Xiong Y, Peterson PL, Lee CP. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16(11):1067-82.

157. Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R. N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001;18(10):977-91.
158. Hansson MJ, Mansson R, Mattiasson G, Ohlsson J, Karlsson J, Keep MF, et al. Brain-derived respiring mitochondria exhibit homogeneous, complete and cyclosporin-sensitive permeability transition. *J Neurochem* 2004;89(3):715-29.
159. Overly CC, Rieff HI, Hollenbeck PJ. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 5):971-80.
160. McCracken E, Hunter AJ, Patel S, Graham DI, Dewar D. Calpain activation and cytoskeletal protein breakdown in the corpus callosum of head-injured patients. *J Neurotrauma* 1999;16(9):749-61.
161. Stone JR, Okonkwo DO, Dialo AO, Rubin DG, Mutlu LK, Povlishock JT, et al. Impaired axonal transport and altered axolemmal permeability occur in distinct populations of damaged axons following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2004;190(1):59-69.
162. Ligon LA, Steward O. Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* 2000;427(3):351-61.
163. Ligon LA, Steward O. Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* 2000;427(3):340-50.

164. Morris RL, Hollenbeck PJ. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* 1993;104 (Pt 3):917-27.
165. Tavazzi B, Signoretti S, Lazzarino G, Amorini AM, Delfini R, Cimatti M, et al. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005;56(3):582-9; discussion 582-9.
166. Chan PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress as determinants of cell death/survival in stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:203-9.
167. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003;10(23):2495-505.
168. Halliwell B, Gutteridge J. Antioxidant defence enzymes: the glutathione peroxidase family. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition ed. Oxford: Oxford Scientific Publications; 2000. p. 140-146, 170-172.
169. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992;59(5):1609-23.
170. Floyd R, Carney J. Age influence on oxidative events during brain ischemia reperfusion. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 1991;12(2-3):155-177.
171. Wei EP, Kontos HA, Dietrich WD, Povlishock JT, Ellis EF. Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of pial arteriolar abnormalities from concussive brain injury in cats. *Circ Res* 1981;48(1):95-103.
172. Muir JK, Tynan M, Caldwell R, Ellis EF. Superoxide dismutase improves posttraumatic cortical blood flow in rats. *J Neurotrauma* 1995;12(2):179-88.

173. Biagas KV, Grundl PD, Kochanek PM, Schiding JK, Nemoto EM. Posttraumatic hyperemia in immature, mature, and aged rats: autoradiographic determination of cerebral blood flow. *J Neurotrauma* 1996;13(4):189-200.
174. Petrov T, Rafols JA. Acute alterations of endothelin-1 and iNOS expression and control of the brain microcirculation after head trauma. *Neurol Res* 2001;23(2-3):139-43.
175. Sokolova T, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B, Dringen R. Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett* 2001;297(2):129-32.
176. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1996;1295(2):222-38.
177. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257(10):5751-4.
178. Cheng Y, Liu M, Li R, Wang C, Bai C, Wang K. Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: an atomic force microscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1999;1421(2):249-60.
179. Reinhart WH, Pleisch B, Harris LG, Lutolf M. Influence of contrast media (iopromide, ioxaglate, gadolinium-DOTA) on blood viscosity, erythrocyte morphology and platelet function. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;32(3):227-39.
180. Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 1999;72(6):2523-30.

181. De Marchena O, Guarnieri M, McKhann G. Glutathione peroxidase levels in brain. *J Neurochem* 1974;22(5):773-6.
182. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 2004;24(7):1531-40.
183. Goss JR, Taffe KM, Kochanek PM, DeKosky ST. The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol* 1997;146(1):291-4.
184. Fan P, Yamauchi T, Noble LJ, Ferriero DM. Age-dependent differences in glutathione peroxidase activity after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2003;20(5):437-45.
185. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Bellomo G, Albano E. Alterations of Na⁽⁺⁾ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500(3):297-305.
186. Svegliati-Baroni G, Di Sario A, Casini A, Ferretti G, D'Ambrosio L, Ridolfi F, et al. The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30(5):868-75.
187. Shibanuma M, Kuroki T, Nose K. Superoxide as a signal for increase in intracellular pH. *J Cell Physiol* 1988;136(2):379-83.
188. Suzuki M, Takeuchi H, Kakita T, Unno M, Katayose Y, Matsuno S. The involvement of the intracellular superoxide production system in hepatic ischemia-reperfusion injury. In vivo and in vitro experiments using transgenic mice manifesting excessive CuZn-SOD activity. *Free Radic Biol Med* 2000;29(8):756-63.

189. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997;17(11):4180-9.
190. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13(1):43-7.
191. Pratico D, Reiss P, Tang LX, Sung S, Rokach J, McIntosh TK. Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2002;80(5):894-8.
192. Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Ellis EF. Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma* 2000;17(5):415-20.
193. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *J Neurochem* 2000;75(5):2178-89.
194. Hsiang JN, Wang JY, Ip SM, Ng HK, Stadlin A, Yu AL, et al. The time course and regional variations of lipid peroxidation after diffuse brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)* 1997;139(5):464-8.
195. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990;21(7):1086-90.

196. Zhong Z, Connor HD, Mason RP, Qu W, Gao W, Lemasters JJ, et al. Role of Kupffer cells in reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(3):1512-7.
197. Giakoustidis DE, Iliadis S, Tsantilas D, Papageorgiou G, Kontos N, Kostopoulou E, et al. Blockade of Kupffer cells by gadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2003;50(5):1587-92.
198. Muriel P, Alba N, Perez-Alvarez VM, Shibayama M, Tsutsumi VK. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;130(2):219-26.
199. Smith ME. Phagocytosis of myelin by microglia in vitro. *J Neurosci Res* 1993;35(5):480-7.
200. Halliwell B GJ. Free radicals, other reactive species and disease. In: Halliwell B GJ, editor. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition ed. Oxford: Oxford Scientific Publications; 2000. p. 105-245.
201. Ding Y, Yao B, Lai Q, McAllister JP. Impaired motor learning and diffuse axonal damage in motor and visual systems of the rat following traumatic brain injury. *Neurol Res* 2001;23(2-3):193-202.
202. Henninger N, Dutzmann S, Sicard KM, Kollmar R, Bardutzky J, Schwab S. Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury. *Exp Neurol* 2005.
203. Tang YP, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T. A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *J Neurotrauma* 1997;14(11):863-73.

204. Shapira Y, Lam AM, Artru AA, Eng C, Soltow L. Ketamine alters calcium and magnesium in brain tissue following experimental head trauma in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13(6):962-8.
205. Smith DH, Okiyama K, Gennarelli TA, McIntosh TK. Magnesium and ketamine attenuate cognitive dysfunction following experimental brain injury. *Neurosci Lett* 1993;157(2):211-4.
206. Mathews KS, Toner CC, McLaughlin DP, Stamford JA. Comparison of ketamine stereoisomers on tissue metabolic activity in an in vitro model of global cerebral ischaemia. *Neurochem Int* 2001;38(5):367-72.
207. Zhang PB, Liu Y, Li J, Chen XL, Tian YF, Sun JJ, et al. [Effects of ketamine and midazolam combination anesthesia on focal cerebral ischemia injury in rats]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005;36(3):351-4.
208. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab Anim Sci* 1987;37(6):736-42.

