

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS PRÉ-
CONDICIONADOS COM NMDA E EXPOSTOS AO TRAUMATISMO
CRANIO-ENCEFÁLICO

LEATRICE CARBONERA DOS SANTOS

CRICIÚMA – JANEIRO 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LEATRICE CARBONERA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS PRÉ-
CONDICIONADOS COM NMDA E EXPOSTOS AO TRAUMATISMO
CRANIO-ENCEFÁLICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Carina Rodrigues Boeck

Co-orientador: Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

CRICIÚMA – JANEIRO 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237a Santos, Leatrice Carbonera dos.
Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro de camundongos pré-condicionados com NMDA e expostos ao traumatismo crânio-encefálico / Leatrice Carbonera dos Santos; orientadora: Carina Rodrigues Boeck. – Criciúma: Ed. do autor, 2009.

51f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2009.

1. Trauma craniocerebral. 2. Enzimas - Avaliação. 3. Metabolismo energético. 4. N-Metil-D-Aspartato. I. Título

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata **LEATRICE DOS SANTOS CARBONERA** sob o título “Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro de camundongos pré-condicionados com NMDA e expostos ao traumatismo crânio-encefálico” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito C.

Criciúma, SC, 29 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão
Membro Relator

Profa Dra Rosane Souza da Silva
Membro Externo

Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula
Membro Interno

Profa Dra Carina Rodrigues Boeck
Orientador

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Coordenador do PPGCS

Dedico esta dissertação a todos os pacientes que sofreram traumatismo crânio-encefálico, aos seus familiares, Terapeutas Ocupacionais, e profissionais que trabalham sempre num âmbito coletivo para melhor inserir estes pacientes na sociedade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da sabedoria e da vida.

A Prof^a. Dr^a. Carina, por aceitar ser minha orientadora.

Ao Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, por aceitar ser meu Co-orientador, pela paciência, conhecimento, companheirismo.

A todos os colegas e professores do mestrado de Ciências da Saúde da UNESC, pela convivência, companheirismo e amizade.

As alunas da graduação e os bolsistas, pela ajuda e disponibilidade no decorrer do projeto.

A Mônica e a Fran (mestrado), pelas informações e amizade.

Ao meu marido, amigo e companheiro Charles o qual teve paciência e respeito pelo meu trabalho.

A minha mãe Elci e aos meus irmãos Luciane, Rui, Larissa pelo carinho.

RESUMO

O pré-condicionamento com NMDA (N-metil-D-aspartato) é uma estratégia de neuroproteção que previne o dano celular induzido por eventos como a isquemia e convulsões. O objetivo deste estudo é investigar a atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro de camundongos pré-condicionados com NMDA e expostos ao traumatismo crânio encefálico. Usa-se neste estudo camundongos CF-1 adultos machos pré-tratados com solução salina ou NMDA (75 mg/kg) 24 horas antes do trauma. Os animais foram anestesiados por inalação com O₂/N₂O (33%:66%) e em seguida submetidos ao modelo experimental de trauma crânio encefálico (TCE) pelo impacto de um peso 50 g no crânio. O metabolismo energético foi avaliado através da atividade da creatina quinase e da cadeia respiratória. Os resultados indicam que o pré-condicionamento com NMDA possui propriedades protetoras em prejuízos celulares provocados por TCE. Tendo em vista o papel protetor do pré-condicionamento com NMDA, entende-se que este mecanismo possa desempenhar funções preventivas ao SNC e/ou de manutenção contra neuropatologias que envolvam o sistema glutamatérgico no TCE.

Palavras-chaves: pré-condicionamento com NMDA; traumatismo crânio-encefálico; metabolismo energético.

ABSTRACT

The pre-conditioning with NMDA (N-methyl-D-aspartate) is a neuroproteção strategy that prevents the induced cellular damage for events as the ischemia and convulsions. The objective of this study is investigating the activity of enzymes of the energy metabolism in brain of mice preconditioned with NMDA and submitted to trauma brain injury (TBI). Mice CF-1 adult male were pretreated with saline or NMDA (75 mg/kg) 24 hours before the trauma. The animals are anesthetized by inhalation with O₂/N₂O (33%:66%) and then subjected to experimental model of brain trauma by the impact of a weight 50 grams in the skull. The enzyme activities were evaluated through the creatine kinase and respiratory chain. Results indicate that the pre-conditioning with NMDA have protective properties in cellular damages provoked by TBI. In view of the protective role of the preconditioning with NMDA, this mechanism can prevent functions to the SNC and/or maintenance against neurotoxicity involving glutamatergic system in TBI.

Keywords: NMDA preconditioning; trauma brain injury; energetic metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC- acidente vascular cerebral

AMPA- ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

iGluR- receptores ionotrópicos

mGluR- receptores metabotrópicos

NMDA- N-metil D-aspartato

SNC- sistema nervoso central

TCE- traumatismo crânio-encefálico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	14
--	----

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
1.1. Traumatismo Crânio-encefálico.....	9
1.2. Sistema glutamatérgico.....	10
1.3. Receptores NMDA.....	10
1.4. Pré-condicionamento com NMDA.....	11
1.5. Metabolismo energético.....	12
1.6. Creatina quinase.....	16
2. Objetivos.....	18
3. Métodos e Resultados: Capítulo 1.....	19
3.1. Artigo - <i>Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma brain injury in brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate</i>	20
4. Discussão.....	44
5. Referências.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Traumatismo Crânio-encefálico

A lesão craniana traumática é uma agressão ao cérebro não de natureza degenerativa ou congênita, mas causada por uma força física externa que resulta em comprometimento das habilidades cognitivas e motoras. Segundo dados do Centro de Pesquisas em Educação e Prevenção da Rede SARAH de Hospitais do Aparelho Locomotor, o traumatismo crânio-encefálico (TCE) é uma importante causa de morte e de deficiência física e mental, sendo apenas superado pelo acidente vascular cerebral (AVC). Na última década foram atendidos 344 pacientes com TCE e 1419 pacientes com AVC na Rede SARAH.

Após o TCE muitos pacientes podem apresentar dor de cabeça, fadiga, danos na memória, déficit de concentração e atenção, mudanças de personalidade, depressão, irritabilidade, distúrbios do sono e disfunção sexual (Lewine et al., 2007). Ainda, diversos déficits motores, de velocidade e equilíbrio também são observados (Brink et al., 1970). A resposta fisiopatológica neuroinflamatória endógena após o TCE, ocorre para defender o SNC dos patógenos e para reparar o tecido lesado, mas esta também é responsável pelo desenvolvimento dos danos ao cérebro e dos resultados adversos observados nos pacientes. Dentre os potenciais promotores de dano secundário decorrente do trauma, o neurotransmissor glutamato tem importante função neste processo danoso.

1.2. Sistema Glutamatérgico

O sistema glutamatérgico é amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em funções cognitivas fundamentais tais como memória e aprendizado, sendo o glutamato considerado o maior neurotransmissor excitatório do SNC (Bressan & Pilowsky, 2003).

Os receptores para glutamato são classificados em receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) agem através de segundos mensageiros e estão presentes em todas as regiões do cérebro. Em condições fisiológicas, a ativação de mGluRs pelo glutamato produz uma corrente pós-sináptica lenta. Os mGluRs Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que quando ativados permitem a entrada de íons Na^+ e/ou Ca^{+2} favorecendo a despolarização do neurônio. Eles são divididos em receptores NMDA e receptores não-NMDA, que por sua vez incluem os receptores *alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionico acid* (AMPA) e cainato. Os receptores AMPA e cainato localizam-se em regiões telencefálicas e medeiam a transmissão rápida nas sinapses excitatórias com duração de somente alguns milissegundos (Bressan & Pilowsky, 2003).

1.3. Receptores NMDA

O receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é um subtipo de receptor ionotrópico para glutamato que quando ativado torna-se altamente permeável a íons Na^+ e principalmente Ca^{+2} .

O potencial excitatório mediado pelos receptores NMDA são mais duradouros que pelos outros receptores ionotrópicos para glutamato (Dale & Roberts, 1985). Fisiologicamente, a ativação de receptores NMDA está associada ao desenvolvimento dos neurônios e à formação das sinapses (Rabacchi et al., 1992), e em processos importantes de plasticidade sináptica, tais como aprendizado e memória (Bliss & Collingridge, 1993).

Entretanto, a excessiva ativação dos receptores NMDA está envolvida na epilepsia e em danos cerebrais associados à isquemia/hipoglicemia (Olney, 1970) e também com o TCE (Clausen & Bullock, 2001). Porque a excessiva ativação dos canais-receptores NMDA desfaz a homeostase celular dos íons Ca^{2+} , levando a excitotoxicidade e a lesão no neurônio provocado pelo aumento do influxo deste íon, além de prejudicar as funções mitocondriais (Clausen & Bullock, 2001). Contrário aos efeitos deletérios da atividade excessiva de NMDA, há padrões fisiológicos da atividade sináptica via NMDA que promovem a sobrevivência neuronal (Hardingham, 2006).

1.4. Pré-condicionamento com NMDA

A neuroproteção é um processo que interrompe e/ou previne uma cascata patológica que ocorre durante um processo de insulto tóxico (Gagliard, 2000). O pré-condicionamento diminui a prevalência de morte celular decorrente de alguma lesão. Assim sendo, em testes de neuroproteção contra excitotoxicidade glutamatérgica, tem-se utilizado o chamado pré-condicionamento químico, onde doses subtóxicas de glutamato, NMDA, ou ácido quinolínico induzem a uma tolerância celular.

Verifica-se que o pré-condicionamento com NMDA é um importante mecanismo celular contra morte no tecido cerebral induzida por isquemia ou por um agonista glutamatérgico, o cainato.

O NMDA e o glutamato podem atuar como agentes de pré-condicionamento químicos para melhorar significativamente o dano isquêmico em fatias de hipocampo (Schurr et al., 2001) e em cultura de células (Xu et al., 2002), ou ainda *in vivo* (Boeck et al., 2004). Assim a administração de doses subconvulsivas de NMDA via intraperitoneal tem sido utilizada como modelo de pré-condicionamento químico *in vivo* contra diversos insultos letais posteriores (Boeck et al., 2004).

1.5. Metabolismo Energético

O cérebro humano representa somente 2% do peso corporal, mas o consumo de energia por esse órgão é de aproximadamente 60% do total de utilização da glicose pelo corpo. O maior gasto desta energia se dá para gerar, processar e transmitir os impulsos nervosos, o que representa a principal função do SNC. O cérebro é dependente do metabolismo para manter sua integridade funcional e estrutural, porém suas reservas energéticas são extremamente pequenas em relação à sua demanda. Devido a esta dependência, o cérebro necessita de um abastecimento contínuo e adequado de oxigênio e glicose. Tanto o oxigênio quanto a glicose é enviado para todas as regiões do cérebro através da circulação sanguínea, e esta é regulada para que os substratos energéticos sejam mantidos constante em diversas situações (Berg et al., 2008). O fornecimento destes substratos é importante para a produção de ATP, principalmente pelo metabolismo oxidativo, onde cerca de 60% a 70% do ATP é utilizado para impulsionar

mecanismos de transporte celular que mantêm o potencial de Na^+ e K^+ na membrana, necessário à transmissão dos impulsos nervosos.

Os processos da vida requerem que as moléculas consumidas como nutrientes sejam quebradas para que se possa extrair energia delas e sejam utilizadas para dar sustentação na formação de novas moléculas (Campbell, 2005). Essas transformações energéticas ocorrem através de uma rede integrada de reações químicas, chamadas de reações metabólicas (Berg et al., 2008). Os produtos finais da degradação de carboidratos, ácidos graxos e proteínas estão envolvidos no processo de respiração celular e, conseqüentemente, na produção de ATP (Lehninger, 2007).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo, sendo a glicólise sua principal via de utilização. Na via glicolítica ocorre uma seqüência de reações catalisadas por enzimas que metabolizam a glicose a duas moléculas de piruvato, sendo que ao longo das reações, parte da energia livre liberada da glicose é conservada na forma de ATP e NADH (Lehninger, 2007). O piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e convertido em acetil-CoA pela ação da enzima piruvato desidrogenase. Todavia, a acetil-CoA também pode ser obtida a partir de aminoácidos e ácidos graxos, porém por outras rotas metabólicas (Murray, 2002).

A acetil-CoA é parte integrante do ciclo de Krebs, sendo este processo a via final comum para a oxidação dos alimentos (carboidratos, lipídios e proteínas). O ciclo de Krebs começa e termina com oxaloacetato, onde uma volta completa no ciclo produz duas moléculas de CO_2 , três de NADH, uma de FADH_2 e um composto de alta energia (ATP ou GTP). Contudo durante todo o ciclo não ocorre perda de água, logo o ciclo tem que estar acoplado a cadeia respiratória, por ela ser capaz de

produzir água usando NADH e FADH₂ gerados no ciclo de Krebs (VOET et al., 2002).

A ação combinada do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte da produção de ATP gerada pelos seres humanos, sendo que a cadeia de transporte de elétrons é composta por quatro complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) e dois componentes que não fazem parte dos complexos, a coenzima Q, que transporta elétrons do CI e CII ao complexo III, e o citocromo c, que transporta elétrons do complexo III ao complexo IV (figura 1).

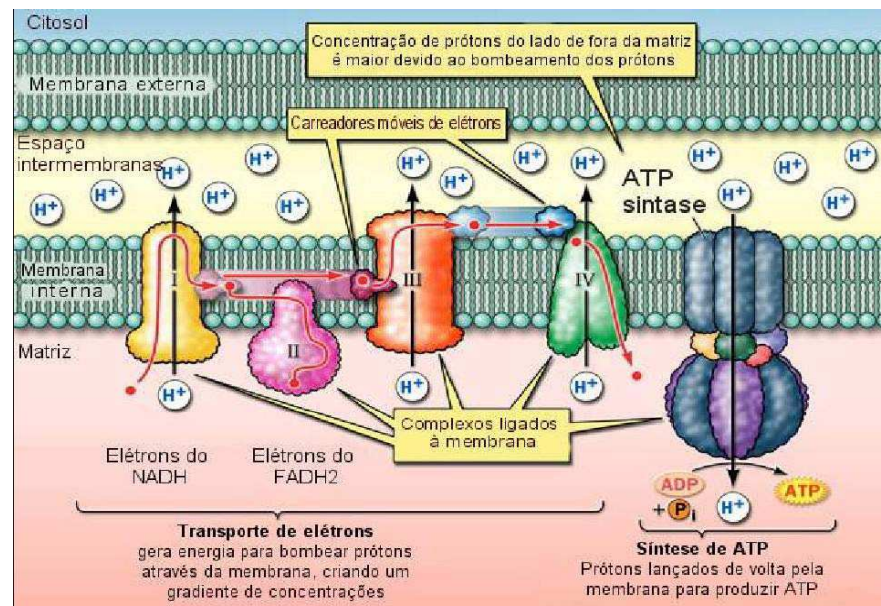


Figura 1. Esquema ilustrativo da Cadeia Respiratória Mitocondrial. Em amarelo está representado o Complexo I; em rosa o Complexo II; e, laranja o Complexo III; e em verde o Complexo IV. A representação da ATP sintase está ao lado direito do Complexo IV. *Fonte:* Lehninger (2007).

O Complexo I, também chamado de *NADH: ubiquinona oxirredutase*, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembranar. O Complexo II, também denominado de *succinato: Q(ubiquinona) oxirredutase* não atinge a parte externa da membrana mitocondrial, tendo contato apenas com a

matriz mitocondrial, é formado pela succinato desidrogenase (SDH), enzima do Ciclo de Krebs que gera FADH_2 na oxidação de succinato a fumarato. Esta enzima tem FAD como grupo protético, assim os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para ao FAD, que se reduz à FADH_2 . Também fazem parte do Complexo II alguns centros de Fe-S e o citocromo b560. Por esses componentes passam os elétrons derivados do FADH_2 antes de finalmente serem doados para a *coenzima Q* para entrarem na cadeia transportadora de elétrons. Duas outras enzimas a *glicerol fosfato desidrogenase* e a *acil-CoA desidrogenase*, transferem do mesmo modo seus elétrons de alto potencial do FADH_2 , para *coenzima Q*, formando ubiquinol (QH_2), o estado reduzido da ubiquinona. O Complexo III, ou *citocromo c oxirredutase*, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O Complexo IV, mais conhecido como *citocromo c oxidase*, contém dois citocromos do tipo a (“a” e “a3”) e dois íons cobre, cada qual associado a um dos dois citocromos. Os íons cobre, alternando entre os estados de oxidação Cu^{2+} e Cu^{1+} , fazem parte do transporte de elétrons. O Complexo IV é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio (O_2) que, liga-se a prótons do meio e converte-se em água. A retirada de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas contribui para o restabelecimento do gradiente de prótons. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados. O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força motriz para a ATP sintase formar ATP na fosforilação oxidativa (Berg et al., 2008).

1.6. Creatina quinase

Outra forma de produção de ATP celular é a partir da enzima creatina quinase (CK). Em 1927 foi descoberta a fosfocreatina (PCr), sete anos mais tarde, em 1934, descobriu-se a reação da creatina quinase. A partir destas descobertas as pesquisas direcionaram-se principalmente nos aspectos bioquímicos, fisiológicos, e patológicos da reação da CK e em seu envolvimento no metabolismo do “fosfato de alta energia” das células e tecidos com altas demandas energéticas. Este sistema é associado a funções importantes, principalmente no cérebro, tais como o tamponamento energético (regenerando ATP) e a transferência do ATP dos sítios produtivos para os de consumo (Wyss et al., 1992).

A CK é uma enzima que possui um papel central no metabolismo energético, principalmente para tecidos com alta demanda energética, como cérebro, músculo cardíaco e esquelético, onde funciona como um efetivo sistema de tampão para os níveis celulares de ATP. Assim sendo, a CK é uma enzima crucial para a homeostase energética, atuando como um sistema auxiliar de manutenção energética (Pilla et al., 2003).

A reação da CK catalisa a transferência metabolicamente reversível do grupamento N-fosforil da fosfocreatina para o ADP regenerando o ATP (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Pilla et al., 2003; Berg et al., 2008).

O sistema CK / PCr mostra diferentes funções integradas em células cerebrais, isto é, proteção de energia temporária, capacidade metabólica, transferência de energia e controle metabólico. Desta forma este sistema é reconhecido como um regulador metabólico importante entre a saúde e a doença (Pilla et al., 2003).

A CK parece estar envolvida em certas condições patológicas relacionadas com déficit de energia cerebral e devido à energia ser necessária para o desenvolvimento e a regulação das funções cerebrais, foi postulado que o prejuízo na função da CK possa ter um papel crítico no processo neurodegenerativo que leva à perda neuronal. Além disso, a baixa atividade desta enzima está associada a fatores neurodegenerativos, como por exemplo, isquemia cerebral, transtorno bipolar, doença de Alzheimer e outros estados patológicos (Tomimoto et al., 1993).

Sabe-se que um dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e conseqüente morte celular (Ankarcrona et al, 1995). Boeck e colaboradores (2004) observaram que o pré-condicionamento com NMDA protege o cérebro de camundongos contra as convulsões e morte celular induzida pelo ácido quinolínico. A neuroproteção também tem sido observada em pré-condicionamento com NMDA contra a morte celular decorrentes da isquemia. A partir destas informações, no presente estudo foi investigado o efeito do pré-condicionamento com NMDA em camundongos submetidos a um traumatismo crânio-encefálico nas enzimas do metabolismo energético cerebral, creatina quinase e cadeia respiratória mitocondrial.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a neuroproteção pelo pré-condicionamento com NMDA sob a atividade enzimática da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase no cerebelo e córtex de camundongos submetidos ao traumatismo crânio-encefálico.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a o efeito do NMDA na atividade enzimática da creatina quinase nas estruturas cerebrais do córtex frontal e cerebelo de animais submetidos ao TCE e pré-condicionados com NMDA;

2.2.2. Analisar o efeito do NMDA na atividade dos Complexos I,II,III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no córtex frontal e cerebelo de animais submetidos ao TCE e pré-condicionados com NMDA.

CAPÍTULO 1

3 METODOS E RESULTADOS

3.1 Artigo

Conforme resolução 01/2007 do PPGCS, os resultados estão apresentados na forma de artigo científico, submetido para publicação no periódico *Mitochondrion*.

**Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma
brain injury in brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate**

Carina R. Boeck^{a*}, Leatrice S. Carbonera^a, Mônia E. Milioli^a, Leandra C. Constantino^a, Gislaine T. Rezin^b, Giselli Scaini^b, Daiane B. Fraga^b, Gustavo Feier^a, João Quevedo^a, Emilio L. Streck^{b*}

^aLaboratório de Neurociências, ^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

Number of pages: 21

Number of figures: 4

Number of tables: 1

Corresponding authors:

Prof. Carina R. Boeck, M.Sc., Ph.D. – Laboratório de Neurociências, PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Phone: #55 48 3431 2759. E- mail: cariboeck@hotmail.com

Prof. Emílio L. Streck, Pharm.D., Ph.D. – Laboratório de Fisiopatologia Experimental, PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Phone: #55 48 3431 2539. E- mail: emiliostreck@gmail.com

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) induces glutamatergic excitotoxicity through NMDA receptors affecting integrity of mitochondrial membrane. Here, preconditioning with NMDA was used to challenge energy metabolism. Mice were treated with low dose of NMDA before TBI and mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities were assessed. When mice were preconditioned and submitted to TBI, the stimulatory effect of the treatments alone was augmented, with exception to creatine kinase, which was inhibited. We suggest that even though NMDA preconditioning and TBI had similar effects on enzyme activities each other manage via opposite mechanisms, because the protective effect of preconditioning are unambiguous.

Keywords: NMDA preconditioning; neuroprotection; trauma brain injury; mitochondrial respiratory chain; creatine kinase.

1. Introduction

The cellular damage following trauma brain injury (TBI) constitutes dynamic pathophysiology of brain as a consequence of combination of primary (unavoidable damage, occurs at the time of injury) with secondary damage (avoidable damage, occurs at variable times after injury). The severity of over-time secondary injury level depends on mechanical impact degree (Katz et al., 2004; Uçar et al., 2006), which could be classified as mild, moderate or severe (Fujimoto et al., 2004; Uçar et al., 2006). The subsequent cascade of events to acute brain injury includes the glutamatergic excitotoxicidade (Bernert and Turski, 1996), ionic imbalance, ATP depletion, proteolysis and oxidative stress (Sullivan et al., 1998). This set of intracellular outcome leads to impairment of synaptic plasticity, with associated modulation of glutamatergic N-methyl-D-aspartic (NMDA) receptors activity (Miller et al., 1990), and alteration of subunits NMDA receptors content (Schumann et al., 2008). Excitotoxicity induced by glutamate involves at least in part intracellular Ca^{2+} levels elevation through excessive activation of NMDA receptors (Choi, 1988) which may affect integrity of mitochondrial membrane through mitochondrial permeability transition pore opening (Schild et al., 2003).

The mitochondrial membrane pore once opened uncouples oxidative phosphorylation, induces reduction of ATP levels, disturbs metabolic homeostasis, releasing cytochrome *c* and inducing cell death by apoptosis (Shimizu et al., 1999). Cell energy overall is obtained through oxidative phosphorylation, a process requiring the action of various respiratory enzyme complexes located in a special structure of the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial respiratory chain. Brain cells contain a large number of mitochondria with high energy demands, being therefore more susceptible to reduction of the aerobic energy metabolism. It is well described

that impairment of energy production caused by mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of ischemia and trauma (Lewen et al., 2000).

Creatine kinase (CK; adenosine-5'-triphosphate: creatine phosphotransferase; E.C. 2.7.3.2) catalyzes the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP regenerating ATP, is a major enzyme of higher eukaryotes that deal with high and fluctuating energy demands to maintain cellular energy homeostasis and to guarantee stable, locally buffered ATP/ADP ratios (Bessman & Carpenter, 1985; McLeish and Kenyon, 2005). In this context, it has been demonstrated that a decrease in CK activity is associated with a neurodegenerative pathway that results in neuronal loss following brain ischemia (Tomimoto et al., 1993).

Despite the well been neurotoxic mechanisms blocked by NMDA receptor antagonists, a neuroprotective action can be evoked by its agonists (Sei et al., 1998; Damschroder-Williams et al., 1995; Jonas et al., 2001). Several studies have shown that preconditioning evokes protection against brain damage induced by ischemia (Kitagawa et al., 1991; Pagliaro et al., 2001; Ferguson et al., 2008), seizures (Sasahira et al., 1995) and closed head injury (Shein et al., 2005). NMDA preconditioning is a “chemical preconditioning” evoked by sub-toxic concentrations of NMDA that induce a tolerance state to a subsequent lethal event (Rejdak et al., 2001). NMDA preconditioning is protective against injury induced by kainate (Ogita et al., 2003) and seizures (Boeck et al., 2004) *in vivo*; also by glutamate (Chuang et al., 1992; Marini et al., 1998; Boeck et al., 2005) or oxygen and glucose-deprivation (Grabb et al., 1999) or both stimulus (Lin et al., 2008) *in vitro*. Preconditioning prevents mitochondrial swelling, preserves membrane integrity and protects mitochondrial energy metabolism during cerebral ischemia (Zhang et al., 2003).

Considering that the cellular injury following TBI may count on mitochondrial disruptions associated to subsequent hypoxia and that preconditioning may preserve energetic metabolism, we here investigated if NMDA preconditioning could alter mitochondrial chain and CK activities as index of neural energetic potential. Besides, the TBI is used as an animal model of cellular damage associated to glutamatergic system dysfunction.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male CF-1 mice (2-3 months, 30-35 g) were obtained from our breeding colony (UNESC). The animals were housed six to cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/ dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care, designed to minimize suffering and limit the number of animal used. Animals were used only once and to avoid the circadian variations all experiments were carried out between 8:00 a.m. and 4:00 p.m. This study was approved by the local ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense, n°776/2007).

2.2. Treatment with NMDA

Animals were pretreated intraperitoneally (i.p.) with NMDA in a low non-convulsive dose (75 mg/kg, 10 mL/kg) (Ferre et al., 1994) or vehicle (saline, 0.9% NaCl, w/v) at 24 hours before cortical trauma injury induction. NMDA was dissolved

at in saline and adjusted to pH 7.4 with NaOH. Mice were observed for 30 min immediately after NMDA administration in acrylic boxes (25x25x25 cm) for occurrence of behavioral alteration (Boeck et al., 2004).

2.3. Diffuse Traumatic Brain Injury

A diffuse TBI was produced using the closed head weight-drop method previously described (Adelson et al., 1996) with minor modifications. The trauma apparatus consists of a metal tube, 1 m length and 10 mm inner diameter, attached to a ring stand. The mice were anesthetized by inhalation with a mixture of O₂/N₂O (33%:66%) through a mask and placed on a foam bed, loosely fixed with its head slightly elevated to avoid spinal cord damage. Brass weight of 50 g with concentric grooves on the face downward fell freely from 80 cm height. Just after impact, the foam bed containing mouse was slid out from under the tube to prevent a second impact on recoil. After trauma, the mice received supporting oxygenation with 100% O₂ until fully awake and were then brought back to their cages. The groups of the animals were divided in accordance with the treatments and time of observations (5-8 mice per group per time = total of 58 animals): *SAL* = saline i.p. + anesthesia (control); *NMDA* = NMDA i.p. + anesthesia; *TBI* = saline i.p. + trauma; *NMDA + TBI* = NMDA i.p. + trauma.

The enzymatic activities were assessed at 6h or 24h after trauma, as described below. At corresponding time-points mice were euthanized for subsequent extraction of brain hemispheres to dissect cerebral cortex and cerebellum with immediately stored to -80°C until use, up to maximal period of one month. Protein content was determined using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

2.4. Mitochondrial respiratory chain enzymes activities

Cerebral cortex and cerebellum structures were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/mL heparin, pH 7.4) for determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities (Complexes I, II, III, IV and SDH). NADH dehydrogenase (Complex I) was evaluated according previously described using the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm (Cassina and Radi, 1996). The activities of succinate:DCIP oxidoreductase (Complex II) and succinate:cytochrome c oxidoreductase (Complex II–III) were determined according to the method of Fischer et al. (1985). Complex II activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm. The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μ M DCIP was preincubated with 40–80 μ g homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, 4 mM sodium azide and 7 μ M rotenone were added and the reaction was initiated by addition of 40 μ M DCIP and was monitored for 5 min. Complex II–III activity was measured by cytochrome c reduction from succinate. The activity of succinate:phenazine oxidoreductase (soluble SDH) was measured following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm in the presence of phenazine methasulphate (PMS). The activity of cytochrome c oxidase (Complex IV) was assayed by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm (Miro et al., 1998). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM n-dodecyl-D-maltoside, 2–4 μ g homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μ g reduced cytochrome c. The activity of Complex IV

was measured at 25°C for 10 min. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min x mg protein.

2.5. Creatine kinase activity assay

Creatine kinase (CK) activity was measured in brain homogenates pre-treated with 0.625 mM lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO₄ and approximately 0.4–1.2 µg protein in a final volume of 100 µL. After 15 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP plus 0.08 µmol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 µmol of *p*-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of 100 µL 2% α -naphthol and 100 µL 0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read spectrophotometrically after 20 min at 540 nm. Results were expressed as units/min x mg protein.

2.6. Cellular viability

Cell survival was measured 24h following TBI by reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Mosmann, 1983; Liu et al., 1997). The tetrazolium ring of MTT is cleaved by various dehydrogenase enzymes in viable cells, and then precipitated as a blue formazan product. Mice were euthanized and cerebral cortex and cerebellum were dissected 24h after TBI. Brain structures were cut in 400 µm thick transversal slices with a McIlwain tissue chopper, followed transfer of the sections to phosphate-buffered saline supplemented with 0.6% glucose (pH 7.4), and separated into individual slices. Two slices from each cerebral

structure were incubated with MTT (0.5 mg/mL) in PBS buffer for 20 min at 37 °C. The medium was aspirated, the precipitated formazan solubilized with dimethyl sulfoxide, and the viable cells quantified spectrophotometrically at a wavelength of 550 nm. Variability due to differences in slice size was minimal, as determined by protein content (data not shown).

2.7. Statistical analysis

Results were analyzed by STATISTICA version 7.0 software (StatSoft, Inc., USA). All data are presented as mean values \pm SE (standard deviation), and each value reflects the mean of 3 to 8 animals per group for enzymatic parameters or the mean of 3 to 6 animals per group for cellular viability analysis. In all cases, statistical analyses were analyzed employing two-way analysis of variance (ANOVA) with NMDA pre-treatment and TBI as the main factors, followed by the Duncan's multiple range test when significant difference was at $P < 0.05$.

3. Results

NMDA preconditioning has been used as strategy of protection against cellular damage after seizures and ischemia. At the present report the effect of TBI on cellular viability and metabolic enzyme activities was determined in mice pretreated with or without NMDA preconditioning 24h before they were submitted to TBI. Although all mice suffered trauma survived up to 24h following TBI, cellular viability was determined by MTT reduction at this time period. The brains from mice submitted to TBI had no signs of external damage to the cerebral cortex at 24 after trauma, no hemorrhages in the periventricular white matter below the cortex, and no apparent distortion of the inner structures. In all groups of mice the impact on the

brain did induce any changes in the cellular viability neither in cerebral cortex (impact area) nor in cerebellum (distant area) (Table 1, $P > 0.05$ in all cases).

Additionally, the mitochondrial enzymes were assessed in cerebral cortex and cerebellum at 6h or 24h after TBI in mice. At this time periods, NMDA has been administered 30h or 48h before enzymatic assays analyzed. The TBI did not affect the basal activity of all enzymatic Complexes, neither of CK after 6h in cerebral cortex. However, after 24h TBI induces an increase over basal of Complex I, II and SDH activities (Fig. 1 and 3A) and did not change CK activity in cerebral cortex (Fig. 4A). At the same assessment, NMDA preconditioning *per se* induced an increase on Complex II, IV and SDH activities in cerebral cortex at 24h period (Fig. 1 and 3A), effect that was augmented by TBI (Fig. 1B and 1D). It is important note that the stimulatory effect of NMDA associated with TBI on Complex I and II began at 6h after TBI in the present analysis (Fig. 1A).

The stimulatory pattern induced by TBI with or without association with NMDA preconditioning at cerebral cortex was observed at cerebellum, with minor alterations. Because, cerebellum is not the brain structure of impact, but it any alteration in its functionality could represent a secondary damage induced by TBI. At cerebellum, TBI induces an increase on Complex I, II, IV, SDH and CK activities after 24h, but did not affect their basal activities after 6h (Fig. 2 and 3B). NMDA preconditioning *per se* also induces an increase on Complex I, II and SDH above basal values after 24h, but has no effect after 6h (Fig. 2A and 2B). Interestingly, CK activity was increased in mice preconditioned during whole period, but TBI induce an increase only after 24h. In opposite, the association of NMDA preconditioning and TBI blunts the effect of each other treatment (Fig. 4B).

5. Discussion

According several studies, we showed that TBI affects mitochondrial respiratory chain enzymes, effect that reflects an important participation of mitochondria in cellular activity after trauma. Also, at the first time, the data showed herein demonstrated the modulation of mitochondrial respiratory chain enzymes by NMDA preconditioning. Clearly, cellular tolerance and injury are distinct cellular process that acts in opposite way, one (preconditioning) leads to protection and another (TBI) to damage. However, the present work verified a common pathway shared by these events. Probably, the increase observed on enzymes activity evoked by NMDA preconditioning prepares cells to subsequent energetic demand (Yadava and Nicholls, 2007), such as that used after TBI. Otherwise, the stimulation of enzymes following TBI could represent the protective mechanism of cells against the damage, because the cells were viable 24h following TBI. Although we can not exclude long-term injury after TBI, up to period analyzed NMDA preconditioning augmented the enzyme activities over stimulation induced by TBI in cerebral cortex (impact area).

Mitochondria is a important organelle involved in the production of reactive oxygen species (ROS), but mitochondrial chain respiratory enzymes are especially susceptible to oxidative stress because of their proximity to ROS production. The observed increase of Complex II and IV activities in cerebral cortex and cerebellum could indicate a less expressive oxidative stress following mild TBI, since these enzymes contribute to prevention of mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome *c* release (Shiva et al., 2007). Cellular damage and long-term behavior deficits could be begun after excitotoxic mechanism triggered by oxidative stress hypoxia-evoked injury subsequent to trauma (Schmidt et al., 2004).

Physiologically, enzymatic and/or nonenzymatic (e.g. glutathione) antioxidants are activated by cells in an effort to neutralize oxidative stress, however studies have demonstrated the overall reducing antioxidant profile in a model of closed head injury in the rat (Shohami et al., 1997; Ansari et al., 2008) and in human CSF following head injury (Bayir et al., 2002). In this way, to induce neuroprotection scavenging ROS has been used in animal models and in the clinical setting (Tyurin et al., 2000; Vink and Van Den Heuvel, 2004).

The degree of oxidative stress is related to severity of TBI insults (Shao et al., 2006). It is clear that trauma to the cortex did not induce cellular damage over 24h nor animal death, which could indicate a mild trauma on the mice, such as previously reported for diffuse brain injury (Foda and Marmarou, 1994). However, even in mild trauma the motor and learning deficits are observed in animal models (Milman et al., 2005) and in humans (Kashluba et al., 2008). Because, subsequent neuronal loss and/or failure of glutamate neurotransmission contributes to the morphological and behavioral alteration attributed to TBI (Tavazzi et al., 2005; Yi and Hazell, 2006). One process involved in the excitotoxicity via overstimulation of NMDA receptors is the large uptake of Na^+ and Ca^{2+} through receptors, with the Na^+ uptake exceeding that of Ca^{2+} . Like this, the extrusion of Na^+ from cells by the Na^+, K^+ -ATPase stimulates oxidative metabolism via mitochondria activity, rather than extrusion of Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase (Nicholls et al., 2007). Thus, considering excitotoxicity after TBI, NMDA receptor antagonists have been used as neuroprotective agents in TBI at clinical trial (Willis et al., 2004) and animal models (Bernert and Turski, 1996; Pohl et al., 1999; Kuo et al., 2007). However human trials of NMDA receptor antagonists have not shown positive effect on clinical outcomes or intolerance side effects (Muir and Lees, 1995). The preconditioning has been investigated as a good strategy of protection

against cellular damage induced by hypoxia/ischemia. *In vivo* preconditioning preserves mitochondrial oxidative phosphorylation after cerebral ischemia (Dave et al., 2001). *In vitro* ROS preconditioning made neuron cells less sensitive to subsequent insults, such as glutamate (Ravati et al., 2000). Also, pretreatment with antioxidants prevents the neuroprotection induced by the preconditioning (Ravati et al., 2001).

In the present report, NMDA preconditioning *per se* induced an increase of CK activity from cerebellum up to 24h and diminished the TBI-induced stimulation of enzyme. The high levels of CK ensured that ADP and ATP levels remained almost constant, effectively buffering the cell against rapid depletion of ATP. Thus, corroborate with our hypothesis of cellular protection behavior after NMDA or TBI aforementioned, NMDA preconditioning and TBI induce stimulation on CK activity, effect abolish when the treatments were associated. Effects similar were observed in mice treated with NMDA preconditioning or with convulsivant quinolinic acid, because both treatments induced stimulation on glutathione S-transferase (GST) activity in hippocampus and their association inhibited particular effect of each other (Vandresen-Filho et al., 2007), while the protective effect of NMDA preconditioning against seizures and cellular damage induced by acid is unambiguous (Boeck et al., 2004).

Recently was observed that NMDA preconditioning in cultured neurons did not alter mitochondrial membrane potential, but increase synaptic firing (Soriano et al., 2006) that is well known increase metabolism (Hopwood et al., 2005). In the preconditioned heart, during ischemia glycolytic ATP production is increased, resulting in higher cellular levels of ATP and creatine phosphate (Brucklacher et al., 2002). Although NMDA preconditioning induces cellular modifications similar to that

observed after excitotoxicity, its end-effect is preventive against injury. Probably, additional mechanisms could be activated in the cells that contribute to their tolerance observed and need to be investigated. It is possible, because preconditioning against oxygen/glucose deprivation activated apoptosis cascade at the same time that activated inhibitors of pro-apoptotic Bcl-2 family (Tauskela et al., 2003) Thus, the stimulatory effect of NMDA preconditioning in mitochondrial chain respiratory enzymes and CK could be the primers to subsequent events that would induce tolerance.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Brazilian National Council Research (CNPq grants, n° 478249/2006-3 to CRB) and UNESC.

References

- Adelson, P.D., Robichaud, P., Hamilton, R.L., Kochanek, P.M., 1996. A model of diffuse traumatic brain injury in the immature rat. *J Neurosurg.* 85, 877-84.
- Ansari, M.A., Roberts, K.N., Scheff, S.W., 2008. A time course of contusion-induced oxidative stress and synaptic proteins in cortex in a rat model of TBI. *J Neurotrauma.* 25, 513-26.
- Bayir, H., Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V., Ruppel, R.A., Adelson, P.D., Graham, S.H., Janesko, K., Clark, R.S., Kochanek, P.M., 2002. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatr Res.* 51, 571-8.
- Bernert, H., Turski, L., 1996. Traumatic brain damage prevented by the non-N-methyl-D-aspartate antagonist 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 5235-40.
- Bessman, S.P., Carpenter, C.L., 1985. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem.* 54, 831-62.
- Boeck, C.R., Ganzella, M., Lottermann, A., Vendite, D., 2004. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia.* 45, 745-50.
- Boeck, C.R., Kroth, E.H., Bronzatto, M.J., Vendite, D., 2005. Adenosine receptors cooperate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology.* 49, 17-24.
- Brucklacher, R.M., Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 2002. Hypoxic preconditioning increases brain glycogen and delays energy depletion from hypoxia-ischemia in the immature rat. *Dev Neurosci.* 24, 411-7.
- Cassina, A., Radi, R., 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 328, 309-16.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1, 623-34.
- Chuang, D.M., Gao, X.M., Paul, S.M., 1992. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol.* 42, 210-6.
- Damschroder-Williams, P., Irwin, R.P., Lin, S.Z., Paul, S.M., 1995. Characterization of the excitoprotective actions of N-methyl-D-aspartate in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 65, 1069-76.
- Dave, K.R., Saul, I., Busto, R., Ginsberg, M.D., Sick, T.J., Perez-Pinzon, M.A., 2001. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21, 1401-10.
- Ferguson, A.L., Stone, T.W., 2008. Adenosine preconditions against ouabain but not against glutamate on CA1-evoked potentials in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci.* 28, 2084-98.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 153, 23-36.
- Foda, M.A., Marmarou, A., 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg.* 80, 301-13.

- Fujimoto, S.T., Longhi, L., Saatman, K.E., Conte, V., Stocchetti, N., McIntosh, T.K., 2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev.* 28, 365-78.
- Grabb, M.C., Choi, D.W., 1999. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci.* 19, 1657-62.
- Hopwood, S.E., Parkin, M.C., Bezzina, E.L., Boutelle, M.G., Strong, A.J., 2005. Transient changes in cortical glucose and lactate levels associated with peri-infarct depolarisations, studied with rapid-sampling microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 391-401.
- Hughes, B.P., 1962. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta.* 7, 597-603.
- Jonas, W., Lin, Y., Tortella, F., 2001. Neuroprotection from glutamate toxicity with ultra-low dose glutamate. *Neuroreport.* 12, 335-9.
- Kashluba, S., Hanks, R.A., Casey, J.E., Millis, S.R., 2008. Neuropsychologic and functional outcome after complicated mild traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 89, 904-11.
- Katz, D.I., White, D.K., Alexander, M.P., Klein, R.B., 2004. Recovery of ambulation after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 85, 865-9.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Kimura, K., Kamada, T., 1991. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.* 561, 203-11.
- Kuo, J.R., Lo, C.J., Chio, C.C., Chang, C.P., Lin, M.T., 2007. Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. *Resuscitation.* 75, 506-14.
- Lewen, A., Matz, P., Chan, P.H., 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma.* 17, 871-90.
- Lin, C.H., Chen, P.S., Gean, P.W., 2008. Glutamate preconditioning prevents neuronal death induced by combined oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 589, 85-93.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 69, 581-93.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Marini, A.M., Rabin, S.J., Lipsky, R.H., Mocchetti, I., 1998. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem.* 273, 29394-9.
- McLeish, M.J., Kenyon, G.L., 2005. Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40, 1-20.
- Miller, L.P., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W., Oleniak, L., Panchision, D., Hamm, R.J., Phillips, L.L., Dixon, C.E., Clifton, G.L., Hayes, R.L., 1990. Excitatory amino acid receptor subtype binding following traumatic brain injury. *Brain Res.* 526, 103-7.
- Milman, A., Rosenberg, A., Weizman, R., Pick, C.G., 2005. Mild traumatic brain injury induces persistent cognitive deficits and behavioral disturbances in mice. *J Neurotrauma.* 22, 1003-10.
- Miro, O., Cardellach, F., Barrientos, A., Casademont, J., Rotig, A., Rustin, P., 1998. Cytochrome c oxidase assay in minute amounts of human skeletal muscle using single wavelength spectrophotometers. *J Neurosci Methods.* 80, 107-11.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke*. 26, 503-13.
- Nicholls, D.G., Johnson-Cadwell, L., Vesce, S., Jekabsons, M., Yadava, N., 2007. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res*. 85, 3206-12.
- Ogita, K., Okuda, H., Yamamoto, Y., Nishiyama, N., Yoneda, Y., 2003. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem*. 85, 1336-46.
- Pagliaro, P., Gattullo, D., Rastaldo, R., Losano, G., 2001. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci*. 69, 1-15.
- Pohl, D., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Stadthaus, D., Hubner, C., Olney, J.W., Turski, L., Ikonomidou, C., 1999. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 2508-13.
- Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Krieglstein, J., 2000. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species. *Brain Res*. 866, 23-32.
- Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Klumpp, S., Krieglstein, J., 2001. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J Neurochem*. 78, 909-19.
- Rejdak, R., Rejdak, K., Sieklucka-Dziuba, M., Stelmasiak, Z., Grieb, P., 2001. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol*. 53, 73-9.
- Sasahira, M., Lowry, T., Simon, R.P., Greenberg, D.A., 1995. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure-induced neuronal injury. *Neurosci Lett*. 185, 95-8.
- Schild, L., Huppelsberg, J., Kahlert, S., Keilhoff, G., Reiser, G., 2003. Brain mitochondria are primed by moderate Ca²⁺ rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *J Biol Chem*. 278, 25454-60.
- Schmidt, O.I., Morganti-Kossmann, M.C., Heyde, C.E., Perez, D., Yatsiv, I., Shohami, E., Ertel, W., Stahel, P.F., 2004. Tumor necrosis factor-mediated inhibition of interleukin-18 in the brain: a clinical and experimental study in head-injured patients and in a murine model of closed head injury. *J Neuroinflammation*. 1, 13.
- Schmidt, O.I., Morganti-Kossmann, M.C., Heyde, C.E., Perez, D., Yatsiv, I., Shohami, E., Ertel, W., Stahel, P.F., 2004. Tumor necrosis factor-mediated inhibition of interleukin-18 in the brain: a clinical and experimental study in head-injured patients and in a murine model of closed head injury. *J Neuroinflammation*. 1, 13.
- Schumann, J., Alexandrovich, G.A., Biegon, A., Yaka, R., 2008. Inhibition of NR2B phosphorylation restores alterations in NMDA receptor expression and improves functional recovery following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 25, 945-57.
- Sei, Y., Fossom, L., Goping, G., Skolnick, P., Basile, A.S., 1998. Quinolinic acid protects rat cerebellar granule cells from glutamate-induced apoptosis. *Neurosci Lett*. 241, 180-4.

- Shao, C., Roberts, K.N., Markesbery, W.R., Scheff, S.W., Lovell, M.A., 2006. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic Biol Med.* 41, 77-85.
- Shein, N.A., Horowitz, M., Alexandrovich, A.G., Tsenter, J., Shohami, E., 2005. Heat acclimation increases hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin receptor expression: implication for neuroprotection after closed head injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 1456-65.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399, 483-7.
- Shiva, S., Sack, M.N., Greer, J.J., Duranski, M., Ringwood, L.A., Burwell, L., Wang, X., MacArthur, P.H., Shoja, A., Raghavachari, N., Calvert, J.W., Brookes, P.S., Lefer, D.J., Gladwin, M.T., 2007. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med.* 204, 2089-102.
- Shohami, E., Beit-Yannai, E., Horowitz, M., Kohen, R., 1997. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17, 1007-19.
- Soriano, F.X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N.R., Bading, H., Hardingham, G.E., 2006. Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci.* 26, 4509-18.
- Sullivan, P.G., Keller, J.N., Mattson, M.P., Scheff, S.W., 1998. Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function. *J Neurotrauma.* 15, 789-98.
- Tauskela, J.S., Brunette, E., Monette, R., Comas, T., Morley, P., 2003. Preconditioning of cortical neurons by oxygen-glucose deprivation: tolerance induction through abbreviated neurotoxic signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285, C899-911.
- Tavazzi, B., Signoretti, S., Lazzarino, G., Amorini, A.M., Delfini, R., Cimatti, M., Marmarou, A., Vagnozzi, R., 2005. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. *Neurosurgery.* 56, 582-9; discussion 582-9.
- Tomimoto, H., Yamamoto, K., Homburger, H.A., Yanagihara, T., 1993. Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 86, 447-55.
- Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G.G., Sokolova, T.V., Ritov, V.B., Quinn, P.J., Rose, M., Kochanek, P., Graham, S.H., Kagan, V.E., 2000. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *J Neurochem.* 75, 2178-89.
- Uçar, T., Tanriover, G., Gurer, I., Onal, M.Z., Kazan, S., 2006. Modified experimental mild traumatic brain injury model. *J Trauma.* 60, 558-65.
- Vandresen-Filho, S., de Araujo Herculano, B., Franco, J.L., Boeck, C.R., Dafre, A.L., Tasca, C.I., 2007. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1184, 38-45.
- Vink, R., Van Den Heuvel, C., 2004. Recent advances in the development of multifactorial therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs.* 13, 1263-74.
- Willis, C., Lybrand, S., Bellamy, N., 2004. Excitatory amino acid inhibitors for traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev.* CD003986.

- Yadava, N., Nicholls, D.G., 2007. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosci.* 27, 7310-7.
- Yi, J.H., Hazell, A.S., 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 48, 394-403.
- Zhang, H.X., Du, G.H., Zhang, J.T., 2003. Ischemic pre-conditioning preserves brain mitochondrial functions during the middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurol Res.* 25, 471-6.

Table 1. Percent cellular survival measured 24h after TBI using MTT assay.

	SAL	NMDA	TBI	NMDA+TBI	P
Cortex	100 ± 25.4	102.6 ± 26	70.1 ± 31.3	69.5 ± 40.5	> 0.05
Cerebellum	100 ± 22	92.5 ± 49	87.5 ± 12.2	87.9 ± 18.3	> 0.05

NMDA was administrated 24h before cortical impact and after 24h the cerebral cortex and cerebellum from mice were prepared to MTT assay accord to Material and Methods. Data are presented as mean of percent control ± DP.

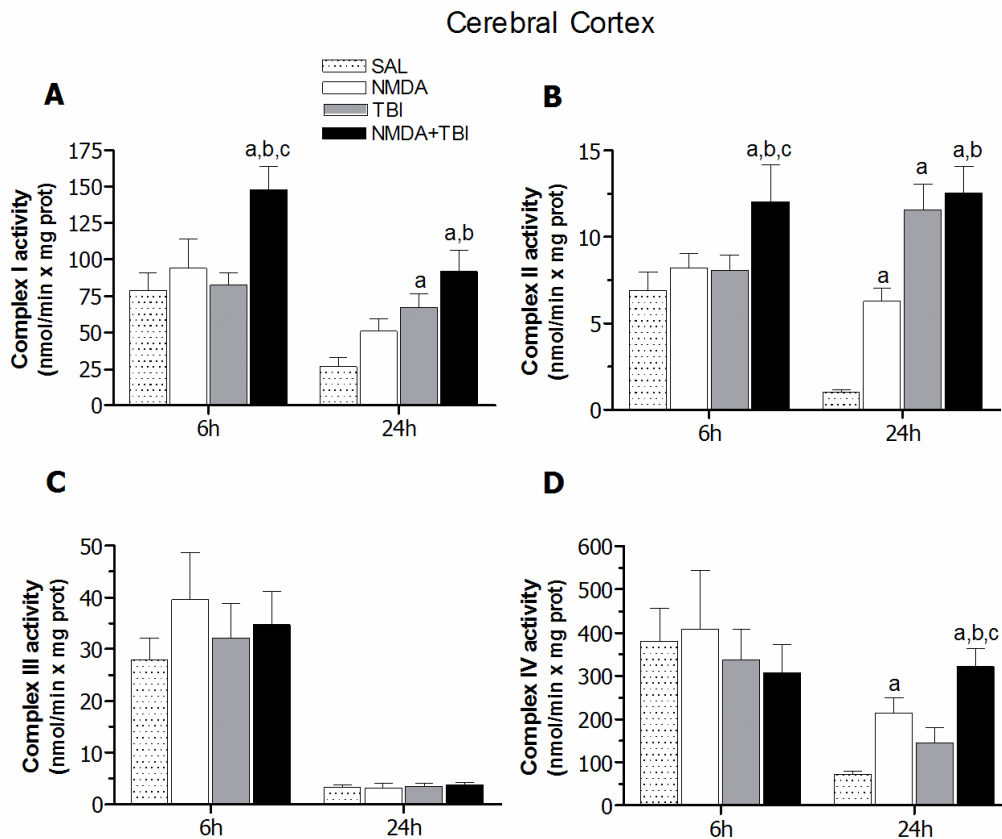


Figure 1. Effect of NMDA preconditioning and TBI on mitochondrial chain complex activities in cerebral cortex of mice. Mice received NMDA (75mg/kg) 24h before TBI and enzymes were assessed at 6h or 24h after trauma. Figures show activity of (A) Complex I, (B) Complex II, (C) Complex III and (D) Complex IV according to Methodology section. Data are expressed as mean of units per mg protein for independent experiments performed in duplicate (6h: n=4-5 mice/group; 24h: n=7-8 mice/group). ^aP<0.05 compared to SAL group; ^bP<0.05 compared to NMDA group; ^cP<0.05 compared to TBI group; two-way ANOVA and post hoc Duncan.

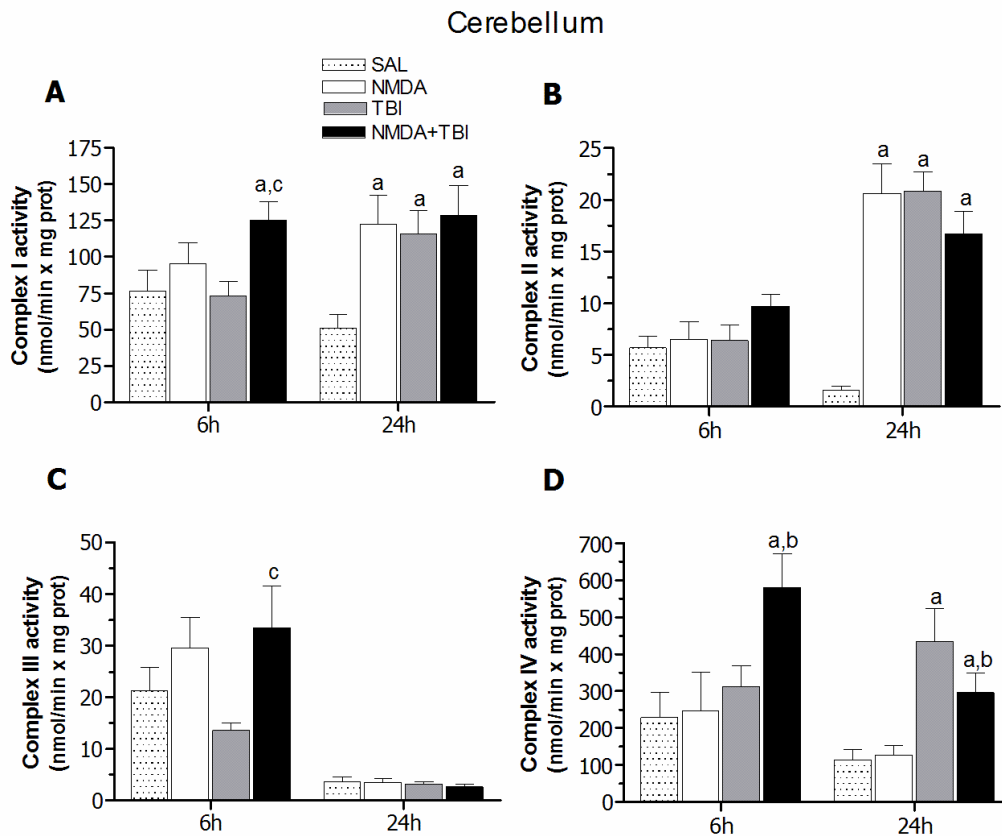


Figure 2. Effect of NMDA preconditioning and TBI on mitochondrial chain complex activities in cerebellum of mice. Mice received NMDA (75mg/kg) 24h before TBI and enzyme activities were assessed at 6h or 24h after trauma. Figures show activity of (A) Complex I, (B) Complex II, (C) Complex III and (D) Complex IV according to Methodology section. Data are expressed as mean of units per mg protein for independent experiments performed in duplicate (6h: n=3-5 mice/group; 24h: n=6-8 mice/group). ^aP<0.05 compared to SAL group; ^bP<0.05 compared to NMDA group; ^cP<0.05 compared to TBI group; two-way ANOVA and post hoc Duncan.

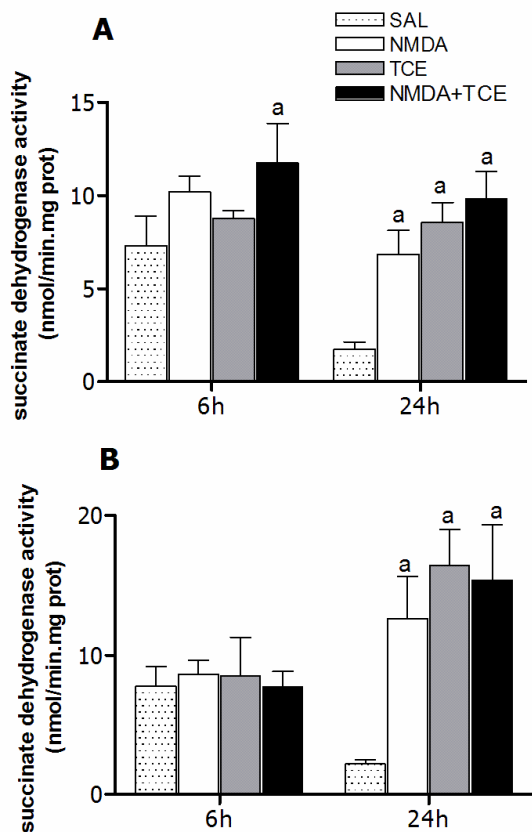


Figure 3. Effect of NMDA preconditioning and TBI on succinate dehydrogenase (SDH) activity in brain of mice. Mice received NMDA (75mg/kg) 24h before TBI and enzyme activity was assessed at 6h or 24h after trauma. Figures show SDH activity in (A) cerebral cortex and (B) cerebellum according to Methodology section. Data are expressed as mean of units per mg protein for independent experiments performed in duplicate (6h: n=4-5 mice/group; 24h: n=7-8 mice/group). ^aP<0.05 compared to SAL group; two-way ANOVA and post hoc Duncan.

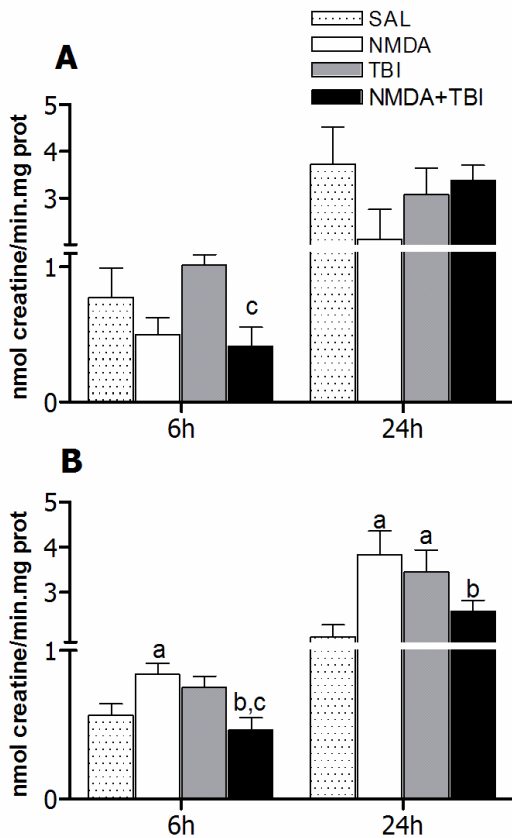


Figure 4. Effect of NMDA preconditioning and TBI on creatine kinase (CK) activity in brain of mice. Mice received NMDA (75mg/kg) 24h before TBI and enzyme activity was assessed at 6h or 24h after trauma. Figures show CK activity in (A) cerebral cortex and (B) cerebellum according to Methodology section. Data are expressed as mean of units per mg protein for independent experiments performed in duplicate (6h: n=4-5 mice/group; 24h: n=4-6 mice/group). ^aP<0.05 compared to SAL group; ^bP<0.05 compared to NMDA group; ^cP<0.05 compared to TBI group; two-way ANOVA and post hoc Duncan.

4. DISCUSSÃO

O glutamato possui um importante papel no desenvolvimento de danos ao SNC. A sobrecarga intracelular de Ca^{2+} durante a excitotoxicidade é ocasionada pela ativação excessiva de receptores NMDA pelo glutamato (Clausen & Bullock, 2001). Diversos estudos clínicos de monitoramento desses eventos têm investigado com pouco sucesso em relação à neuroproteção e o TCE.

De acordo com pesquisas de Gagliardi (2000) doses subtóxicas de NMDA fornecem um pré-condicionamento químico ao cérebro, que conduz a tolerância celular a doses tóxicas subseqüentes de agonistas de receptores glutamatérgicos; e que o objetivo da neuroproteção é fazer com que a cascata patológica se interrompa.

O córtex frontal agrupa funções motoras, de expressão lingüística, memória e funções de planejamento mental do comportamento. Lesões no córtex frontal podem levar o indivíduo a ter crises convulsivas tônicas, clônicas e espasmos, assim como déficits cognitivos (Manrezza, 2003). Os resultados deste estudo são mediados por danos em córtex frontal e cerebelo. Porém, não se descarta também que outras áreas cerebrais tenham sido afetadas.

O trauma leve através de um aparato de queda de peso em formato de bala produziu neste estudo déficit metabólicos nos camundongos. Estes dados estão de acordo com as observações clínicas que mostram o prejuízo motor do TCE moderado (Adelson et al., 1997; Piot-Grosjean et al., 2001). A administração de dose subconvulsivante de NMDA via intraperitoneal tem sido utilizada como modelo de pré-condicionamento químico frente a insultos no cérebro (Boeck et al., 2004). Resultados de pesquisas de Bernert & Turski (1996) indicam que os antagonistas de

NMDA possuem propriedades neuroprotetoras em processos excitotóxicos provocados por ferimentos devido a traumas no cérebro de ratos jovens. Alguns estudos em modelo animais de trauma mostraram efeitos benéficos dos antagonistas do receptor NMDA como, por exemplo, o MK-801, a dextrometorfana, D-CPP (Hamm et al., 1993), assim como o íon Mg^{2+} (Heath & Vink, 1999).

As seqüelas neurofisiológicas do TCE são consequência da combinação de lesões cerebrais focais e difusas. Os focos do abalo envolvem geralmente os lobulos frontais. O dano axonal difuso é relacionado ao prejuízo da atenção, à velocidade do processamento mental e às funções do lóbulo frontal (Junque, 1999). E as lesões no cérebro devido ao TCE conduzem não somente aos déficits funcionais na área da lesão, mas igualmente perturbam a rede neuronal estrutural intacta que está conectada ao local da lesão (Wiese et al., 2004).

O prejuízo da produção energética causado pela disfunção mitocondrial é implicado na patogênese da isquemia e do traumatismo (Lewen et al, 2000). A creatina quinase auxilia no controle de flutuações energéticas, mantendo a homeostase da energia celular e garantindo relações localmente estáveis de ATP/ADP (Bessman & Carpenter, 1985).

O sistema creatina/fosfocreatina/creatina quinase é importante para homeostase energética por exercer funções de integração, tal como manter níveis energéticos temporários, transferência de energia e controle metabólico (Wallimann et al., 1992; Khuchua et al., 1998; Schlattner & Wallimann, 2000). A maioria da energia celular é obtida através da fosforilação oxidativa, um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos localizados na membrana interna da mitocôndria, a cadeia respiratória mitocondrial (Rex et al., 2004; Horn & Barrientos, 2008). Sabe-se que a diminuição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial

causa um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e que os complexos I e III são bastante sensíveis e podem ser inibidos por elas (Adam-Vizi, 2005; Navarro & Borveris, 2007). O pré-condicionamento impede o dano mitocondrial, preserva a integridade da membrana e protege o metabolismo energético mitocondrial durante a isquemia cerebral.

O trauma não afetou a atividade basal de todos os complexos enzimáticos, nem da CK após 6h no córtex cerebral. As atividades, entretanto, depois que 24h do trauma induziu um aumento do Complexo I e II e não mudaram a atividade das CK no córtex cerebral. Na mesma avaliação, o pré-condicionamento com NMDA induziu um aumento na atividade dos Complexos II e IV no córtex cerebral no período 24h, efeito esse que exacerbou aquele induzido pelo trauma. É importante saber que o efeito estimulador de NMDA associado com o trauma no Complexo II começou em 6h após trauma na análise atual. A estimulação induzida pelo trauma com ou sem associação com o NMDA ocorreu em menor proporção no cerebelo. Porque, o cerebelo não é a estrutura de impacto no cérebro, mas uma alteração de sua funcionalidade poderia representar um dano secundário induzido por trauma. No cerebelo, o trauma induziu um aumento das atividades no Complexo I, II, e IV, e da CK após 24h, mas não afetou suas atividades basais após 6h. O pré-condicionamento com NMDA por si induziu um aumento no Complexo I, II acima dos valores basais após 24h, mas não tem nenhum efeito após 6h. Interessante, a atividade das CK foi aumentada nos camundongos pré-condicionados durante todo o período, mas o trauma induziu um aumento somente depois de 24h. A succinato desidrogenase teve sua atividade aumentada após 24 h tanto no córtex quanto no cerebelo, isso pode estar refletindo na atividade aumentada do Complexo II no córtex e cerebelo. Provavelmente, os dados representam um aumento na produção

de ATP como forma de suprir a necessidade energética das células após o dano. No córtex em 6h o grupo NMDA e submetido ao TCE estão aumentados nos complexos I e II, ou seja, os complexos I e II são as vias de entrada de elétrons para cadeia respiratória, possivelmente o NMDA está envolvido com estimulação da produção de ATP como forma de diminuir o dano nas células. Já o trauma danifica as células precisando de mais energia para que as células possam desenvolver suas funções. Estando os dois primeiros complexos ativados, mais elétrons serão transportados até o Complexo IV e mais ATP será formado. Pode-se concluir que TCE afeta a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, e que este efeito reflete uma participação importante nas mitocôndrias na atividade celular após o traumatismo.

O pré-condicionamento com NMDA previne a morte celular induzida pelo glutamato, tem efeito neuroprotetor em condições de privação de O_2 , e adapta o metabolismo energético reforçando a neuroproteção, por isso foi capaz de prevenir o aumento observado na atividade da CK no grupo TCE, e houve um aumento dos complexos nas atividades.

5. REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. **Antioxidants & Redox Signaling**, 7: 1140-1149. 2005.
- ADELSON PD; DIXON CE; ROBICHAUD P; KOCHANNEK, P. M. Motor and cognitive functional deficits following diffuse traumatic brain injury in the immature rat. **Journal Neurotrauma**, 14: 99–108, 1997.
- ANKARCRONA M, DYPBUKT JM, BONFOCO E, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S, LIPTON SA, NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, 15: 961-973, 1995.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1114 p., 2008.
- BERNERT H; TURSKI L. Traumatic brain damage prevented by the non-Nmethyl-D-aspartate antagonist 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f] quinoxaline. **PNAS USA**, 93(11):5235-5240, 1996.
- BESSMAN SP, CARPENTER, C.L. The creatine–creatine phosphate energy shuttle. **Annu Rev Biochem**, 54:831–862; 1985.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory; long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361: 31-39, 1993.
- BOECK, C. GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, 45:745-750, 2004.
- BOECK, CR, KROTH, EH; BRONZATTO, MJ; VENDITE, D. Adenosine receptors cooperate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. **Neuropharmacology**, 49(1):17-24, 2005.
- BRESSAN RA; PILOWSKY LS. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 25(3):177-183, 2003.
- BRINK JD; GARRETT AL; HALE WR; NICKEL VL; WOO–SAM J. Recovery of motor and intellectual function in children sustaining severe head injuries. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 12:565–571, 1970.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3.ed Porto Alegre: Artes Médicas, 2005. 752 p.
- CLAUSEN T; BULLOCK R. Medical Treatment and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. **Current Pharmaceutical Design**, 7: 1517-1532, 2001.

- CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron.**, 1(8), 623-634, 1988.
- DALE, N.; ROBERTS, A. Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials: excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. **J. Physiol.**, 363: 35-59, 1985.
- FUJIMOTO ST, LONGHI, L; SAATMAN, KE; MCINTOSH, TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28: 365–378; 2004.
- GAGLIARD, R. J. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 58(2-B): 583-588, 2000.
- HAMM RJ; O'DELL DM; PIKE BR; LYETH B. Cognitive impairment following traumatic brain injury: the effect of pre- and post-injury administration of scopolamine and MK-801. **Brain research**, 1(4):223-226, 1993.
- HARDINGHAM, G.E. Pro-survival signalling from the NMDA receptor. **Biochemical Society Transactions**, 34(5): 936-938, 2006.
- HEATH DL; VINK R. Concentration of brain free magnesium following severe brain injury correlates with neurologic motor outcome. **Journal of neurosurgery**, 6(6):504-509, 1999.
- HORN D; BARRIENTOS A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. **IUBMB Life**, 60: 421-429. 2008
- HUGHES, B.P. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. **Clinica Chimica Acta**, 7:597-604, 1962.
- JUNQUE C. Neuropsychological sequelae of head injury. **Revista de neurologia**, 28(4):423-9, 1999.
- KATZ DI; WHITE DK; ALEXANDER MP; KLEIN RB. Recovery of ambulation after traumatic brain injury. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, 85:865–869, 2004.
- KHUCHUA ZA; QIN W; BOERO J; CHENG J; PAYNE RM; SAKS VA; STRAUSS AW. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. **The Journal of Biological Chemistry**, 273: 22990-22996. 1998.
- LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. Sarvier, São Paulo, 2007.
- LEWEN, A; MATZ, P; and CHAN, P.H. Free radical pathways in CNS injury. **J. Neurotrauma**, 17: 871–890, 2000.

- LEWINE JD; DAVIS JT; BIGLER ED; THOMA R; HILL D; FUNKE M; SLOAN JH; HALL S; ORRISON WW. Objective documentation of traumatic brain injury subsequent to mild head with MEG. SPECT and MRI. **The Journal of head trauma rehabilitation**, 22(3):141-155, 2007.
- MANREZZA ML. **Epilepsia na infância e na adolescência**. São Paulo:Lemos, 2003.
- MURRAY, R.K.; MAYES, D.K.G.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. 9. ed São Paulo: Atheneu, 2002. 919 p.
- NAVARRO A; BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, 292: 670-686. 2007.
- OLNEY JW. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. **Nature**, 227:609-611, 1970.
- PILLA, C.; CARDOZO, R.F.O.; DORNELLES, P.K.B.; DULTRA FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain α -amino acids in the brain cortex of rats. **International journal of developmental neuroscience**, 21: 145 – 151, 2003.
- PIOT-GROSJEAN O; WAHL F; GOBBO O; STUTZMANN JM. Assessment of Sensorimotor and Cognitive Deficits Induced by a Moderate Traumatic Injury in the Right Parietal Cortex of the Rat. **Neurobiology of Disease**, 8:1082-1093, 2001.
- RABACCHI, S.; BAILLY, Y.; DELHAYE- BOUCHAUD, N. et al. Involvement of the N-methyl- D aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. **Science**, 256: 1823-1825, 1992.
- REX A; SCHICKERT R; FINK H. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 77: 303-307. 2004.
- SCHLATTNER U; WALLIMANN T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 17314-17320. 2000.
- SCHILD, L; HUPPELSBERG, J; KAHLERT, S; KEILHOFF, G; REISER, G. Brain mitochondria are primed by moderate Ca²⁺ rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. **J. Biol. Chem.**, 278, 25454–25460; 2003.
- SCHURR A; PAYNE RS; TSENG MT; GOZAL E.; GOZAL D. Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transport inhibition in rat hippocampal slices. **Neuroscience**, 307:151–154, 2001.

- SULLIVAN, P. G; KELLER, J. N; MATTSON, M. P; SCHEFF, S.W. Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function. **J. Neurotrauma**, 15:789–798; 1998.
- TOMIMOTO H, YAMAMOTO K, HOMBURGER HA, YANAGIHARA T. Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. **Acta Neuropathologica**, 86: 447-455, 1993.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 931 p.
- WALLIMANN T; WYSS M; BRDICZKA D; NICOLAY K; EPPENBERGER HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **The Biochemical Journal**, 281: 21-40. 1992.
- WIESE H; STUDE P; NEBEL K; OSENBERG D; VOLZKE V; ISCHEBECK W; STOLKE D; DIENER HC; KEIDEL M. Impaired movement-related potentials in acute frontal traumatic brain injury. **Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, 115(2):289-98, 2004.
- WYSS, M.; SMEITINK, J.; WEYERS, R. A.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**, 1102(2): 119-166, 1992
- WYSS, M. KADDURAH-DAOUR, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological reviews**, 80(3): 1107 – 1213, 2000.
- XU GP; DAVE KR; VIVERO R; SCHMIDT-KASTNER R; SICK TJ; PEREZPINZON MA. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. **Brain Research**, 952:153–158, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)