

CAROLINE AMARAL MACHADO

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS
ASSOCIADAS A PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2019

CAROLINE AMARAL MACHADO

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS
ASSOCIADAS A PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Aline Silva de Miranda

Co-orientadora: Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Área de concentração: Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2019

043

Machado, Caroline Amaral.

Estudo de alterações comportamentais e cognitivas associadas a processos inflamatórios em modelo experimental de traumatismo cranioencefálico leve [manuscrito] / Caroline Amaral Machado. - 2019.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Aline Silva de Miranda. Coorientadora: Dra. Ana Cristina Simões e Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Traumatismos Craniocerebrais. 2. Transtornos Neurocognitivos. 3. Inflamação. 4. Comportamento e Mecanismos Comportamentais. I. Miranda, Aline Silva de. II. Silva, Ana Cristina Simões e. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

CAROLINE AMARAL MACHADO

316/2019
entrada
1º/2017
2017671279

Às **nove horas** do dia **27 de fevereiro de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS ASSOCIADAS A PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO LEVE**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Aline Silva de Miranda**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq. | Instituição | Indicação |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------|
| Dra. Aline Silva de Miranda | UFMG | APROVADA |
| Dra. Lucíola da Silva Barcelos | UFMG | APROVADA |
| Dr. Paulo Pereira Christo | Faculdade de Medicina- UFMG | APROVADA |

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2019.**

Dra. Aline Silva de Miranda (Orientadora) Aline Silva de Miranda

Dra. Lucíola da Silva Barcelos Lucíola da Silva Barcelos

Dr. Paulo Pereira Christo Paulo Pereira Christo

Erika Cristina Jorge
Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

“Dedico este trabalho à minha avó Josefa (in memorian), com todo amor.”

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela sabedoria e resiliência nos dias difíceis;

Aos meus pais por todo o amor e compreensão e por cuidarem de mim;

À minha família por todo o suporte, especialmente a minha irmã por ser minha parceira de vida e por acreditar em mim;

À professora Aline pela oportunidade de trabalho, pela gentileza nos ensinamentos e por ser um exemplo a ser seguido na minha carreira;

À professora Ana Cristina pela orientação e todo o apoio no projeto;

A todos os meus amigos e membros do Laboratório de Neurobiologia Professora Conceição Machado, pelo apoio durante o Mestrado, especialmente a Bruna, Cristian, Larissa, Luiz, Grazielle, Rodrigo e Gabriel;

À professora Milene Rachid pelo auxílio e orientação nos experimentos;

A todos os professores que me auxiliaram e que me forneceram estrutura de seus Laboratórios para a realização dos meus experimentos durante o meu mestrado;

A todos os meus amigos pelo apoio e amizade;

A todos os membros da banca pela disponibilidade;

À todas as pessoas que ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desse estudo;

À FAPEMIG, CAPES e Brain Research Foundation pelo suporte financeiro.

RESUMO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é qualquer lesão dirigida ao crânio, causada por força mecânica externa. O TCE é a principal causa de mortalidade e incapacidade, principalmente em crianças e jovens adultos. Muitos estudos têm relacionado o TCE com déficits neuropsiquiátricos e cognitivos posteriores ao evento traumático, como depressão, ansiedade e prejuízos de memória e aprendizado. Além disso, estudos têm mostrado que processos inflamatórios podem estar associados com a evolução de lesões secundárias, bem como com o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos após o evento traumático. Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi investigar o papel de processos inflamatórios no desenvolvimento de alterações comportamentais e cognitivas, transitórias e permanentes, em modelo experimental de TCE leve. Para tanto, foi padronizado o modelo de TCE experimental por queda de peso em camundongos machos da linhagem C57BL/6 que foram avaliados em testes comportamentais e cognitivo após a lesão. Com o protocolo de lesão padronizado, não houve alteração do peso corporal e os camundongos apresentaram baixa mortalidade e recuperação do dano neurológico após as primeiras 6 horas depois do TCE. Análises histopatológicas do encéfalo foram realizadas por técnica de microscopia e a avaliação de mediadores inflamatórios foi realizada por CBA (*Citometric Bead Array*). As análises histopatológicas revelaram infiltração de neutrófilos e hemorragia no córtex 6 horas depois do TCE. Os animais apresentaram comportamento do tipo ansioso às 12 horas e que se manteve até 30 dias após o TCE, e também, apresentaram comportamento do tipo depressivo 72 horas depois da lesão. Associado a essas alterações de comportamento, foi encontrado variações nos níveis das citocinas interleucina (IL) 10 e fator de necrose tumoral (TNF) no córtex pré-frontal e no hipocampo dos camundongos em diferentes momentos após a lesão. Esses resultados mostram que o modelo de TCE padronizado foi capaz de gerar uma lesão compatível com um TCE leve, além de que, sugerem que processos neuroinflamatórios podem ter envolvimento nas alterações de comportamento em camundongos submetidos ao modelo experimental de TCE leve.

Palavras-chave: Traumatismo Cranioencefálico; Transtornos cognitivos; Alterações comportamentais; Neuroinflamação; Modelo de queda de peso.

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a cerebral lesion caused by an external mechanical force against the skull. TBI is the leading cause of death and disability, especially among children and young adults. Many studies have associated TBI with the development of neuropsychiatric and cognitive deficits after the traumatic event, including depression, anxiety and impairment in learning and memory. Moreover, several studies have shown that inflammatory processes may be related to the evolution of secondary lesions, as well as to the development of neuropsychiatric disorders after traumatic event. In this context, the main objective of this study was to investigate the role of inflammatory processes in the development of transient and permanent behavioral changes in the experimental model of mild TBI. For this, the model of experimental TBI by weight loss was standardized using male mice of the C57BL / 6 lineage that were evaluated in behavioral and cognitive tests standardized after the injury. With the standardized lesion protocol, no change in body weight was found and the mice presented low mortality and recovery of neurological damage after the first 6 hours after TBI. Histopathological analyzes of the brain were performed by microscopy techniques and the evaluation of inflammatory mediators was performed by CBA (*Citometric Bead Array*). Histopathological analyzes revealed neutrophil infiltration and hemorrhage in the cortex 6 hours after TBI. The animals presented anxiety-like behavior 12 hour and were maintained up to 30 days after the TBI and presented depressive-like behavior 72 hours after the injury. Associated with these behavioral changes, was found variations in cytokines interleukin (IL) 10 and tumor necrosis factor (TNF) levels in the prefrontal cortex and the hippocampus of the mice at different times after injury. These results show that the standardized TBI model was able to generate a lesion compatible with a mild TBI, in addition, they suggest that neuroinflammatory processes may have involvement in the behavioral changes in mice submitted to the experimental model of mild TBI.

Key-Words: Traumatic Brain Injury, Cognitive Impairment, Behavior Changes, Neuroinflammation, Weight drop model.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCE – Traumatismo cranioencefálico

EUA – Estados Unidos da América

SNC – sistema nervoso central

BHE – Barreira hematoencefálica

DATASUS – departamento de informática do Sistema Único de Saúde

ECG – Escala de coma de Glasgow

DASS-21 - *Depression anxiety and stress scale*

NGF – fator de crescimento nervoso

IL- interleucina

PLF – percussão por fluido

ICC – impacto cortical controlado

TUNEL – *terminal transferase mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*

NSS – escore neurológico de gravidade

TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 12 |
| 2- REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Definição do TCE leve..... | 13 |
| 2.2 Epidemiologia do Traumatismo cranioencefálico | 13 |
| 2.3 Gravidade do Traumatismo cranioencefálico | 16 |
| 2.4 Classificações do Traumatismo cranioencefálico..... | 17 |
| 2.5 Alterações cognitivas e comportamentais no TCE em humanos..... | 19 |
| 2.6 Processos Inflamatórios e TCE..... | 21 |
| 2.7 O uso de modelos animais no estudo do TCE | 22 |
| 2.7.1 Modelo de percussão lateral por fluido | 22 |
| 2.7.2 Modelo de impacto cortical controlado..... | 24 |
| 2.7.3 Modelo de queda de peso | 24 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 26 |
| 4. HIPÓTESE | 26 |
| 5. OBJETIVOS..... | 26 |
| 5.1 Objetivo Geral..... | 26 |
| 5.2 Objetivos específicos | 27 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 6.1 Aspectos éticos | 27 |
| 6.2 Animais..... | 27 |
| 6.3 Modelo Experimental de TCE | 28 |
| 6.3.1 Padronização do modelo de queda de peso em camundongos..... | 28 |
| 6.3.2 Procedimentos da cirurgia..... | 29 |
| 6.4 Avaliação de alterações comportamentais e cognitivas..... | 30 |
| 6.5 Medida dos níveis de citocinas pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA).. | 37 |
| 6.6 Histologia..... | 38 |
| 6.7 Análise Estatística..... | 38 |
| | 10 |

| | |
|--|----|
| 7. RESULTADOS | 39 |
| 7.1 Padronização do modelo de TCE..... | 39 |
| 7.2 Avaliação neurológica pela escala NSS e da massa corporal após o TCE | 41 |
| 7.3 Avaliação da atividade locomotora após o TCE pelos testes do campo aberto e de footprint | 43 |
| 7.4 Caracterização de alterações comportamentais e cognitivas após o TCE | 44 |
| 7.4.1 Análise do comportamento do tipo ansioso | 44 |
| 7.4.2 Análise do comportamento do tipo depressivo | 46 |
| 7.4.3 Análise de alterações cognitivas | 47 |
| 7.5 Caracterização de alterações morfológicas em diferentes regiões do encéfalo de camundongos da linhagem C57Black6 após o TCE..... | 47 |
| 7.6 Avaliação do processo inflamatório via análise dos níveis de citocinas em distintas porções do encéfalo de camundongos machos da linhagem C57Black6 submetidos ao TCE..... | 48 |
| 8. DISCUSSÃO | 52 |
| 9. CONCLUSÕES..... | 59 |
| REFERÊNCIAS | 60 |

1- INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é qualquer agressão dirigida ao encéfalo, crânio, meninges ou vasos, causada por uma força mecânica externa que gera lesão anatômica e comprometimento da função normal das estruturas afetadas (Gaudêncio e Leão, 2013). O impacto no cérebro causado pelo contato direto de objetos e a lesão cerebral, decorrentes da pressão pela aceleração e desaceleração repentina, têm sido descritos na literatura como exemplos de força mecânica externa (McAllister, 2011; Werner e Engelhard, 2007). O TCE é uma das principais causas de incapacidade e mortalidade entre adultos jovens em todo o mundo. Todos os anos nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que a incidência anual fique em torno de 1,7 milhão de casos. Esses casos representam aproximadamente 77 bilhões de dólares em despesas médicas diretas e indiretas. Sendo que, o TCE leve é responsável pela maior taxa de ocorrência em comparação com o traumatismo craniano moderado a grave (Faul *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2017).

A lesão causada no momento do trauma é definida como lesão primária e causa distúrbio funcional nas estruturas do sistema nervoso central (SNC). A lesão secundária se deve a mecanismos celulares e bioquímicos que podem desenvolver-se durante dias, meses ou anos após a lesão primária (Maas *et al.*, 2008). Em decorrência dessa lesão, vários podem ser os prejuízos ao indivíduo, incluindo perda ou diminuição do nível de consciência e lesões mais graves, que, quando não levam imediatamente ao óbito, podem resultar em distúrbios cognitivos e no aumento da ocorrência de transtornos comportamentais, como depressão e ansiedade (Langlois *et al.*, 2006). Lesões secundárias podem também induzir estresse oxidativo, perda da função da barreira hematoencefálica (BHE) e neuroinflamação, que é o principal fator de agravamento do quadro. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo padronizar um modelo experimental de

TCE em camundongos para o estudo do papel da resposta inflamatória no desenvolvimento de transtornos comportamentais após o trauma.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição do TCE leve

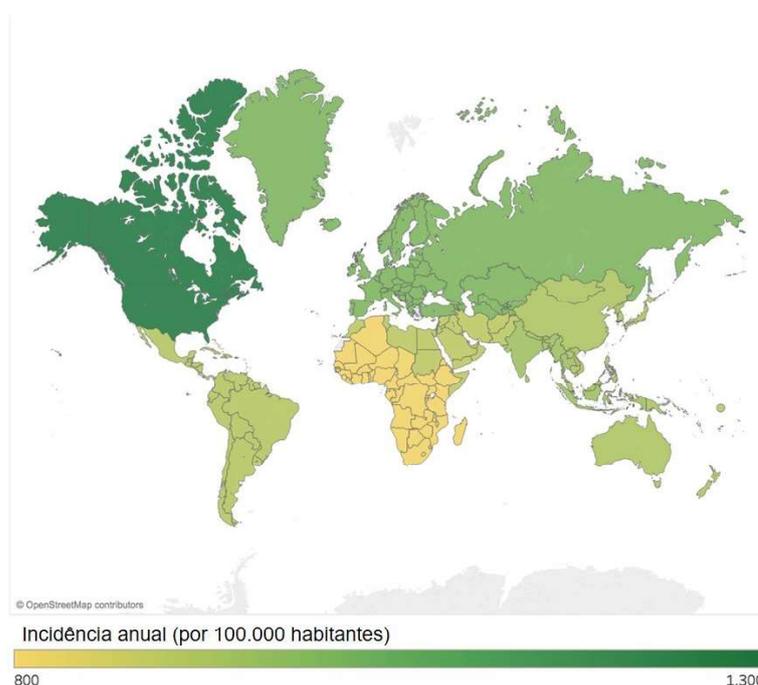
O TCE leve é definido como lesão cerebral, causada por força mecânica externa, que pode resultar em perda de consciência, desorientação e demais sinais clínicos de disfunção neurológica (convulsões, letargia, dor de cabeça e irritabilidade) (CDC, 2003).

2.2 Epidemiologia do Traumatismo cranioencefálico

O TCE tem grande importância em saúde pública pois afeta principalmente adultos jovens em idade economicamente ativa tanto nos países industrializados como em desenvolvimento (figura 1). Nos EUA, cerca de 1,7 milhões de pessoas são afetadas a cada ano, 290.000 são hospitalizadas e há ocorrência de 50.000 óbitos, fazendo com que os gastos relacionados ao TCE fiquem em torno de 77 bilhões de dólares por ano (Faul *et al.*, 2010; Maas *et al.*, 2008). As taxas de hospitalizações entre idosos com mais de 75 anos têm também aumentado, sendo as quedas o principal mecanismo de lesão. Isso vai de acordo com um estudo que mostrou que, entre os anos de 2002 a 2006, os principais mecanismos de lesão foram quedas. Entretanto, a principal causa de morte foi por acidentes automotivos, apresentando taxas maiores entre jovens com faixa etária de 20 a 24 anos (Faul *et al.*, 2010). Outro levantamento, também conduzido nos EUA, mostrou que entre os anos de 2007 a 2013 as maiores taxas de hospitalizações e óbitos foram observados em idosos com mais de 75 anos, seguido de crianças menores de 4 anos e

jovens de 15 a 24 anos, sendo que, em geral, a maioria dos acometidos pertenciam ao sexo masculino (Taylor *et al.*, 2017). É possível que os dados de ocorrência de TCE em todo o mundo estejam subestimados, pois nem sempre o paciente com trauma leve procura a unidade de saúde (Dewan *et al.*, 2018).

Incidência de TCE por região – OMS



Adaptado de Dewan, *et al.* 2018

Figura 1: Mapa mostrando a incidência do TCE (casos por 100.000 habitantes) em diferentes regiões subdivididas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Acredita-se que em outras regiões do mundo os impactos causados no sistema de saúde pelo TCE sejam tão expressivos quanto nos EUA. Contudo, os estudos em algumas regiões são mais incertos e escassos (McAllister, 2007). Na Europa, a incidência do TCE é amplamente estudada. Entretanto, por não haver uma padronização de como os dados obtidos são notificados, é difícil traçar um perfil epidemiológico para o continente. Um

estudo recente realizado usando dados epidemiológicos gerados em países europeus mostrou que o principal mecanismo de lesão está mudando, de acidentes de trânsito para quedas (Brazinova *et al.*, 2016). Em uma unidade de urgência no Reino Unido, a incidência de TCE foi de 453 para 100.000 habitantes (Yates *et al.*, 2006). Já na Alemanha foi de 332 para 100.000 habitantes (Rickels *et al.*, 2010), sendo o estudo retrospectivo britânico realizado entre 1997 e 2003 e o estudo prospectivo alemão ocorreu no período de 2000 a 2001.

Dados epidemiológicos sobre o TCE no Brasil são escassos (Gaudêncio e Leão, 2013). Apesar disso, os poucos estudos realizados mostram ocorrência anual de 125.000 internações hospitalares relacionadas ao TCE, taxa de mortalidade de cerca de 5.1 por 100 mil habitantes e custos de despesas hospitalares que chegam a uma média de 70.960.000 de dólares por ano (Almeida *et al.*, 2016). Um estudo com base em registros do departamento de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) dos anos de 2001 a 2007 mostrou que, os homens foram a maioria expressiva dos indivíduos hospitalizados naquele período, chegando a mais de 80%, e que as quedas e os acidentes de trânsito foram os principais mecanismos de lesão traumática (Fernandes e Silva, 2013; Magalhães *et al.*, 2017). Além disso, é importante ressaltar que a maioria dos indivíduos acometidos pelo TCE no Brasil estão numa faixa etária economicamente ativa (20 a 29 anos de idade), e que outra parcela expressiva de indivíduos são maiores de 65 anos e, dessa forma, mais vulneráveis às sequelas que o TCE pode causar, maximizando os transtornos pessoais e sociais gerados pela doença (Fernandes e Silva, 2013). Recentemente, Magalhães e colaboradores (2017) tentaram traçar o perfil epidemiológico de TCE da população brasileira por meio de revisão sistemática de trabalhos publicados no país. Foram selecionados 7 estudos realizados em diferentes regiões do Brasil. Os

resultados apresentavam diferenças muito grandes, como a mortalidade variando de 2 a 22,9 %, faixa etária entre 15 a 40 anos e tempo de estudo de 7 meses a 6 anos. Além disso, também foram encontradas diferenças metodológicas significativas que dificultaram a elaboração de uma conclusão sobre o atual estado epidemiológico de TCE no país.

2.3 Gravidade do Traumatismo cranioencefálico

A variação do quadro clínico do paciente após as primeiras horas do TCE tem relação direta com alterações fisiológicas que ocorrem como consequência da lesão. O escore da Escala de coma de Glasgow (ECG) prediz as manifestações clínicas da evolução da lesão, e é utilizado na determinação do nível de consciência, na definição da gravidade do TCE e no auxílio para interpretação do estado clínico do paciente. A ECG foi publicada pela primeira vez por Graham Teasdale e Bryan Jennet, que eram professores da Universidade de Glasgow, em 1974. A ECG começou a ser mais difundida a partir de 1980, quando uma publicação internacional de referência começou a recomendar o seu uso (Teasdale *et al.*, 1983). Atualmente, a ECG é utilizada em mais de 75 países. A observação da abertura ocular e da resposta verbal e motora é realizada a partir de 6 horas após o evento traumático. Como, por exemplo, é observado se o paciente consegue localizar dor, obedecer a comandos e se ele usa palavras incompreensíveis (quadro 1). A ECG tem pontuação do escore que varia de 3 a 15 pontos, sendo 3 indicativo de morte cerebral e 15 nível de consciência considerado normal. É necessário ressaltar que para a determinação de morte cerebral outros parâmetros devem ser avaliados, principalmente pelo fato de que o uso de álcool e drogas, bem como, condições de hipóxia podem interferir na avaliação pela ECG. A partir da avaliação utilizando ECG é que se classifica

o TCE em leve (14 e 15 pontos), moderado (9 a 13 pontos) ou grave (3 a 8 pontos) (Gentile *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014; Settervall *et al.*, 2011).

Quadro 1: Parâmetros da ESCALA DE COMA DE GLASGOW

| Variáveis | | Escore |
|------------------------|--------------------------|--------|
| Abertura ocular | Espontânea | 4 |
| | À voz | 3 |
| | À dor | 2 |
| | Nenhuma | 1 |
| Resposta verbal | Orientada | 5 |
| | Confusa | 4 |
| | Palavras inapropriadas | 3 |
| | Palavras incompreensivas | 2 |
| | Nenhuma | 1 |
| Resposta motora | Obedece a comandos | 6 |
| | Localiza dor | 5 |
| | Movimento de retirada | 4 |
| | Flexão anormal | 3 |
| | Extensão anormal | 2 |
| | Nenhuma | 1 |

Baseado em Teasdale e Jennett, 1974

2.4 Classificações do Traumatismo cranioencefálico

As lesões cerebrais do TCE possuem diversas classificações didáticas que facilitam o entendimento da complexa fisiopatologia da doença. Em relação à extensão da lesão, elas podem ser divididas em focais ou difusas. Entretanto, observa-se que a maioria das lesões são heterogêneas, com predominância de um tipo. Nas lesões focais somente uma região do cérebro é acometida, enquanto que nas lesões difusas, toda a extensão do cérebro encontra-se comprometida. O hematoma subdural agudo traumático é um exemplo importante de lesão focal, enquanto que a lesão axonal difusa é um exemplo clássico de lesão difusa (McKee e Daneshvar, 2015).

Os hematomas são resultantes da ruptura de vasos sanguíneos em decorrência da lesão traumática. No caso do hematoma subdural, o sangue fica acumulado entre a dura-máter e a aracnóide. Como o espaço extradural tem grande capacidade de dilatação, pode haver um grande acúmulo de sangue, por todo o córtex cerebral. Esse fato está relacionado a alta mortalidade causada por esse tipo de hematoma, e, por isso, muitos estudos clínicos tem como alvo esse tipo de lesão focal. Esse tipo de hematoma está relacionado com traumas gerados por força mecânica externa de grande energia cinética (Andrade *et al.*, 2009; Badke *et al.*, 2011).

A lesão axonal difusa é caracterizada por danos aos axônios dos neurônios resultantes da aceleração e desaceleração do crânio no momento da lesão. Pelo fato da caixa craniana e o encéfalo possuírem densidades distintas, quando submetidos às mesmas forças inerciais, respondem de maneira diferente levando à lesão (McKee e Daneshvar, 2015).

Em relação ao tipo, as lesões podem ser classificadas em abertas e fechadas. As lesões abertas são aquelas em que o trauma impacta diretamente o parênquima encefálico,

como em lesões por projétil de arma de fogo. No caso das lesões fechadas, não há contato com o material intracraniano, como é o caso das lesões axonais (Andrade *et al.*, 2009).

No que se refere às alterações estruturais e funcionais que podem ocorrer após o TCE, as lesões podem ser classificadas em lesões primárias ou secundárias. As lesões primárias são aquelas que ocorrem no momento do trauma, como a lesão axonal difusa e as contusões. Lesões primárias são ocasionadas por impacto direto sobre neurônios, células da glia e vasos, causando ruptura da membrana dessas estruturas e podendo estabelecer posteriormente processos de distúrbio e estresse metabólico no local afetado. Além de causar alterações na barreira hematoencefálica e na circulação sanguínea local. As lesões secundárias estão relacionadas com mecanismos celulares, bioquímicos e histopatológicos que ocorrem após a lesão primária, principalmente excitotoxicidade, morte neuronal e ativação de astrócitos e micróglia. Essa progressão do estado fisiopatológico pode ser observada em minutos, dias ou até meses após a lesão primária (Bramlett e Dietrich, 2007; Mei *et al.*, 2017). Tem sido relatada morte de neurônios corticais, do hipotálamo e tálamo em decorrência da lesão traumática (Keane *et al.*, 2001), entretanto outras alterações podem ser observadas. Animais submetidos ao TCE apresentaram modificações nas sinapses excitatórias no hipocampo, associadas com neurodegeneração, aumento da atividade inflamatória e danos cognitivos (Schumann *et al.*, 2008). Os mecanismos de lesão secundária também se relacionam com a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que o aumento da produção de radicais livres pode causar danos sobre neurônios e astrócitos (Radi *et al.*, 2002).

2.5 Alterações cognitivas e comportamentais no TCE em humanos

Os transtornos neuropsiquiátricos são uma das principais causas de incapacidade após o TCE (Fann *et al.*, 1995). Dentre estes, a depressão e a ansiedade são os principais transtornos que estão diretamente relacionados aos pacientes que sofreram TCE, e, muitas vezes, aparecem como comorbidade (Jorge *et al.*, 1993; Koponen *et al.*, 2002; Osborn *et al.*, 2017). Um estudo que incluiu 201 participantes com idades variando de 18-94 anos mostrou que, mais da metade dos participantes apresentou depressão ao longo de 6 meses após o TCE grave. Sintomas de ansiedade e depressão foram avaliados pela escala DASS-21 (*Depression Anxiety and Stress Scale*). Foi verificada a ocorrência de ansiedade e de estresse associados a depressão (Wiseman *et al.*, 2015). Fann e colaboradores (1995) encontraram depressão e ansiedade quando analisaram 50 pacientes após TCE. Nesse estudo, os pacientes depressivos e/ou ansiosos tiveram pior desempenho quando avaliados quanto a sua saúde mental e função emocional, usando o *Medical Outcomes Study Health Survey*, quando comparados aos pacientes com TCE que não possuíram esses sintomas neuropsiquiátricos. Ressalta-se que um estudo que analisou veteranos de guerra ao longo de 50 anos após TCE grave, mostrou que o risco de desenvolvimento de depressão aumentou de acordo com a maior gravidade da lesão, ao longo das décadas (Holsinger *et al.*, 2002). Um estudo retrospectivo que incluiu 60 pacientes com diferentes níveis de gravidade de trauma craniano, dos quais 25 % eram TCE leve. Embora não haja estratificação nesse estudo foi relatada ocorrência de transtornos do pânico e psicóticos, além de depressão em diferentes momentos após o TCE (Koponen *et al.*, 2002).

O comprometimento cognitivo também é uma sequela que tem sido frequentemente relatada em pacientes que sofreram TCE (Aleman *et al.*, 2013; Gardner *et al.*, 2017; Miotto *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 2017). Um estudo com 189 adultos jovens que sofreram TCE leve encontrou comprometimento cognitivo em diferentes escalas de

avaliação às 24 e 72 horas após o TCE (Bloom *et al.*, 2017). Li e colaboradores (2016) mostraram que pacientes idosos que sofreram TCE leve tiveram uma aceleração na idade de início dos danos cognitivos em 2 ou mais anos, quando comparados com idosos da mesma faixa etária que não foram vítimas de TCE.

A diferença na gravidade da lesão parece estar relacionada com desfechos distintos tanto em relação a prejuízos cognitivos quanto comportamentais. Contudo, alguns trabalhos não fazem distinção da gravidade da lesão (Miotto *et al.*, 2010) ou não fornecem a pontuação da ECG (Gardner *et al.*, 2017).

2.6 Processos Inflamatórios e TCE

A inflamação é um processo fisiológico de grande importância para a manutenção da homeostase do organismo. Entretanto, quando uma resposta inflamatória se torna exacerbada, pode ocorrer a lesão tecidual, morte celular e neurodegeneração (Wallach *et al.*, 2013)). Após um quadro de TCE há ativação de células da glia, migração de células da periferia e liberação de mediadores inflamatórios. Acredita-se que o aumento da concentração de mediadores inflamatórios pode desempenhar papel importante na fisiopatologia de várias doenças no SNC, incluindo o TCE (Chiu *et al.*, 2016; Woodcock e Morgani-Kossmann, 2013).

As citocinas atuam como mediadores da resposta imunológica e são capazes de regular a atividade e a proliferação de diferentes células, o que leva à resposta inflamatória para os locais de lesão (Oliveira *et al.*, 2011). As citocinas, devido ao seu papel fundamental na resposta imune, têm sido associadas a diferentes doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, sendo consideradas muitas vezes potenciais marcadores diagnósticos e de prognóstico. De fato, muitos estudos têm mostrado a

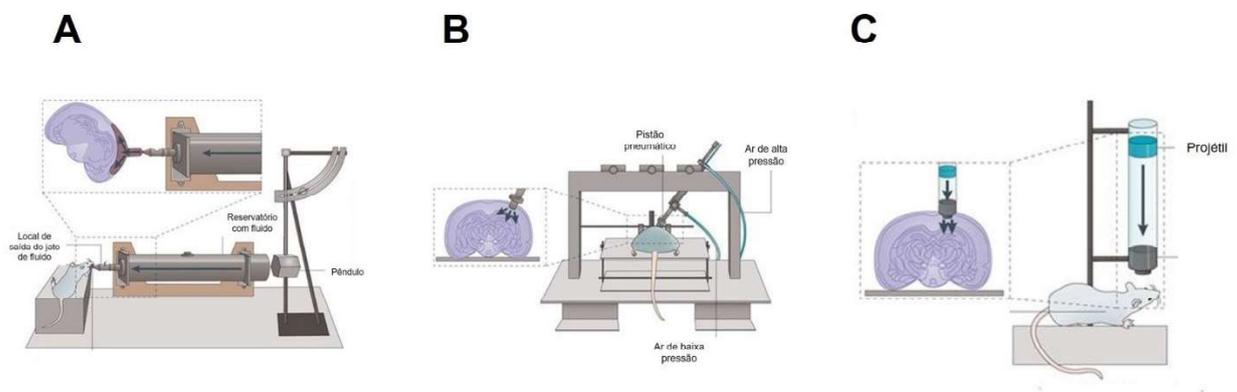
liberação de diferentes citocinas em resposta ao TCE em humanos. Um estudo usando microdiálise encontrou aumento nos níveis de interleucina (IL) 1, IL-6 e fator de crescimento nervoso (NGF) em pacientes acometidos pelo TCE grave, 36 horas após a lesão (*Winter et al.*, 2002). Bell e colaboradores (1997) encontraram aumento nos níveis de IL-10 no líquido de crianças 3 dias após TCE grave. Bem como, também foi encontrado nesse estudo, um pico de IL-6 depois de 48 horas e um pico de IL-1beta e de IL-10 3 dias após TCE. Um estudo que avaliou o líquido de pacientes que sofreram um TCE grave, mostrou um aumento nos níveis de IL-6 e IL-9 (*Kumar et al.*, 2016), reforçando o potencial envolvimento de mediadores inflamatórios na patogênese do TCE.

2.7 O uso de modelos animais no estudo do TCE

Os modelos animais têm sido utilizados como ferramenta na pesquisa biomédica, pois facilitam o teste de hipóteses, tem a possibilidade de manipulação genética e de práticas terapêuticas que seriam antiéticas em humanos (*Wojnarowicz et al.*, 2017). Diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos para o estudo do TCE. Por causa da heterogeneidade da doença, um único modelo não é capaz de reproduzir toda a complexa fisiopatologia do TCE. Por outro lado, os modelos animais são importantes ferramentas para o estudo de lesões secundárias. Há 3 principais modelos que se têm destacado em estudos com roedores. São eles, o modelo de percussão lateral por fluido (PLF), impacto cortical controlado (ICC) e de queda de peso (*Xiong et al.*, 2013).

2.7.1 Modelo de percussão lateral por fluido

No modelo de PLF, a lesão é causada pela pressão gerada por um fluido quando o pêndulo do aparato incide sobre um pistão, como pode ser visto no esquema da figura 2A. Por meio de uma craniotomia realizada anteriormente, essa pressão atinge a dura-máter e é capaz de gerar hemorragia intracraniana, contusão cortical e edema cerebral. A craniotomia é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade deste modelo. Mediante a manutenção da altura do pêndulo, é possível realizar a regulação da pressão, gerando diferentes graus de lesão que pode ser focal ou difusa (McIntosh *et al.*, 1989). Esse modelo possui alta taxa de mortalidade em relação aos outros principais modelos. Além disso, não é capaz de reproduzir fraturas de crânio, que ocorrem frequentemente no TCE moderado a grave em humanos. Entretanto, o PLF é eficiente em gerar prejuízos cognitivos e de comportamento, semelhantes aos que são observados na clínica (Alder *et al.*, 2011; McIntosh *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.* 2013). Um recente estudo em camundongos C57Black6 mostrou que o modelo de PLF foi capaz de causar neurodegeneração, detectada pela marcação com TUNEL (*Terminal Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*), 9 dias após a lesão. Além disso, associada à degeneração, ocorreu déficit sensorimotor no teste de *grid walk*, 8 dias depois da lesão (Bhowmick *et al.*, 2018).



Adaptado de Xiong *et al.*, 2013

Figura 2: Esquema mostrando os principais tipos de modelo experimental de TCE. A- Modelo de percussão lateral por fluido; B- Modelo de impacto cortical controlado; C- Modelo de queda de peso.

2.7.2 Modelo de impacto cortical controlado

O modelo de ICC causa uma lesão focal semelhante à de pacientes humanos e pode ser usado para o estudo de mecanismos moleculares e genéticos (Cernak, 2005). Neste modelo, um dispositivo com pistão pneumático entra em contato com a dura-máter, via craniotomia, causando uma lesão com profundidade e velocidade definidas pelo experimentador (figura 2B) (Onyszchuk *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 1995). Este modelo é capaz de gerar hematoma subdural, quebra de BHE e lesão axonal. Déficits cognitivos e de comportamento são frequentemente observados nesse modelo (Braun *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2005). Entretanto, o ICC possui custos e complexidade de operação mais altos em comparação aos outros modelos (Xiong *et al.*, 2013).

2.7.3 Modelo de queda de peso

O modelo de queda de peso tem sido descrito como o que mais se aproxima da clínica. O modelo é capaz de induzir alterações cognitivas e comportamentais, que possuem bastante similaridade com aquelas encontradas em pacientes humanos. Nesse modelo, um projétil de peso determinado incide, em queda livre, sobre o crânio exposto do animal (figura 2C) (Flierl *et al.*, 2009).

É importante notar que existem algumas variações quanto à classificação neste modelo, que se refere principalmente ao local de lesão, cuidados pré-operatórios e desfecho patológico após o TCE (Xiong *et al.*, 2013). De modo inegável, cada grupo de pesquisa trabalha com um protocolo distinto de lesão, mas o princípio geral que rege o modelo será o mesmo. Quando se consideram essas variações, o modelo de queda de peso

pode ser dividido em modelo de Feeney, Shohami, Marmarou e Maryland. Contudo, essas divisões não são muito didáticas e parece não haver consenso na literatura sobre o seu uso, pois grande parte dos trabalhos não fazem nenhuma referência a ela. Portanto, nesse trabalho essa divisão não será considerada e o modelo padronizado será referido apenas como modelo de queda de peso.

Esse modelo possui como vantagem o fato de que a gravidade da lesão gerada pode ser controlada pela mudança na altura e no peso do projétil usado (Albert Weissenberger e Siren, 2010). Além disso, não necessita de elaborada preparação pré-lesão, fazendo com que seja mais simples de ser executado no laboratório (Flier *et al.*, 2009). O crânio é exposto por meio de um procedimento simples conhecido como incisão da linha média.

Existem poucos trabalhos na literatura que fazem associação entre sintomas neuropsiquiátricos, como a ansiedade e a depressão, e o TCE. São ainda mais raros estudos que tentam propor algum mecanismo subjacente ao surgimento desses sintomas e que se relacione com a lesão secundária. A maior parte dos trabalhos em que são investigados comportamentos do tipo ansioso ou depressivo fazem parte de estudos de tratamento, em que se está investigando o efeito protetor de determinada droga sobre o surgimento e/ou diminuição dos sintomas.

Estudos utilizando esse modelo já mostraram alterações cognitivas, comportamentais e locomotoras em camundongos (Baratz *et al.*, 2010; Schwarzbald *et al.*, 2010). Animais submetidos ao modelo de queda de peso apresentam sintomas associados ao comportamento ansioso e depressivo, lesões microscópicas e macroscópicas no cérebro que podem ser detectadas na histologia (Schwarzbald *et al.*,

2010), além de aumento do nível de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Chhor *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos fisiopatológicos das alterações comportamentais e cognitivas, transitórias e permanentes, associadas ao TCE permanecem pouco elucidados. Recentemente, trabalhos pré-clínicos têm mostrado que as mais diversas estratégias de modulação podem ter papel neuroprotetor na lesão secundária e nas suas sequelas comportamentais e cognitivas. A resposta imune parece estar diretamente relacionada ao surgimento dessas alterações. A limitada compreensão da patogênese do TCE dificulta o reconhecimento e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Uma melhor compreensão do papel de mediadores inflamatórios, que atuam como biomarcadores, e sua associação com as disfunções comportamentais e cognitivas, poderá abrir perspectivas para o tratamento das lesões secundárias das vítimas de TCE.

4. HIPÓTESE

Há relação entre resposta inflamatória e o surgimento de transtornos neuropsiquiátricos, transitórios ou permanentes, resultantes do TCE.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de alterações comportamentais, transitórias e permanentes, no modelo experimental de TCE.

5.2 Objetivos específicos

- Padronizar o modelo experimental de TCE por queda de peso;
- Caracterizar as alterações comportamentais e cognitivas transitórias e/ou permanentes após o TCE;
- Caracterizar alterações morfológicas resultantes do TCE no encéfalo de camundongos machos da linhagem C57BL/6;
- Avaliar o processo inflamatório pela análise das concentrações de citocinas em distintas porções do encéfalo de camundongos machos da linhagem C57BL/6 submetidos ao TCE.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o número de protocolo 250/2017 (anexo 1).

6.2 Animais

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens, com peso de 20 a 30 gramas e idade de 10 a 12 semanas obtidos no Biotério Central da UFMG. Os animais foram divididos em 7 grupos de acordo com o período em que foram analisados após a submissão ao TCE: grupo controle, grupo de 6, 12, 24 e 72 horas após

TCE, e grupo de 15 e 30 dias após TCE. Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos do Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da UFMG, por todo o período de experimento, com ciclo de iluminação de 12 horas por dia, e com acesso *ad libitum* à água e ração.

6.3 Modelo Experimental de TCE

6.3.1 Padronização do modelo de queda de peso em camundongos

O modelo de queda de peso foi construído com base em Marmarou *et al.*, 1994 (figura 3A). O processo de padronização ocorreu ao longo de 10 meses e 4 protocolos distintos foram utilizados. Do protocolo inicial para o protocolo de uso, as principais alterações foram o ajuste na concentração e volume de anestésico, e mudança do tipo e peso do projétil. No protocolo inicial, foi utilizado 70µl de anestésico numa proporção de salina/xilazina/cetamina de 4/1/3, sendo ajustado no protocolo final para 120µl a 8/1/1. A cetamina (cloridrato) utilizada tem concentração de 10% e a xilazina (cloridrato) tem concentração de 2%. O projétil que inicialmente era utilizado apresentava uma ponta metálica e pesava 25 gramas, e foi substituído por um projétil de 15 gramas feito de resina (figura 3B).

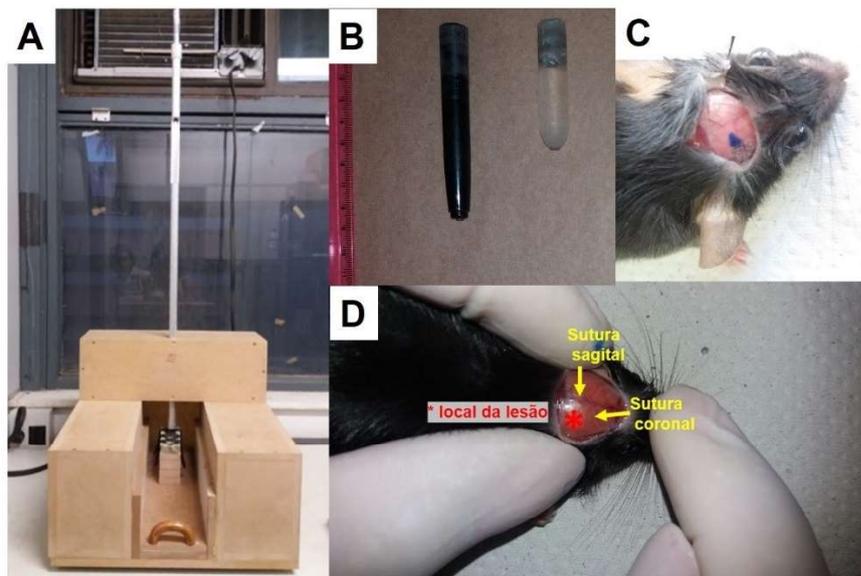


Figura 3: Imagem mostrando a padronização do modelo de queda de peso. A- Modelo de queda de peso; B- Comparação entre os dois tipos de projétil usado; C e D- Local exato de lesão.

Os animais foram submetidos ao TCE experimental pelo modelo de queda de peso, em que um projétil de peso determinado incidiu em queda livre sobre o crânio do animal (Flierl *et al.*, 2009). A lesão foi realizada na região parietal direita do crânio (figura 3C e 3D), sendo que a área de contato do projétil com a área a ser lesionada foi de 3 mm. Nos animais do grupo controle, houve apenas a exposição da calota craniana por incisão da linha média, sem a ocorrência da lesão traumática, e, em seguida, sutura.

6.3.2 Procedimentos da cirurgia

- 1- O animal foi anestesiado usando associação de xilazina/cetamina.
- 2 – O crânio foi exposto pela incisão da linha média
- 3 - O animal foi posicionado num suporte
- 4 – Foi realizada marcação do local exato da lesão, entre a sutura sagital e a sutura coronal na região parietal direita.

- 5 – O animal foi preso ao suporte, e o suporte fixado no equipamento de trauma.
- 6 – Com a ajuda de um laser de luz, foi realizada a averiguação do local da lesão e, em seguida, o projétil de 15 gramas foi solto de uma altura de 60 cm, em queda livre, em direção ao crânio do animal, gerando o TCE.
- 7 – A sutura foi realizada e o animal foi colocado em uma manta térmica para recuperação.
- 8 – O animal foi monitorado visualmente até sua recuperação, recebendo antibiótico tópico no local da lesão.

6.4 Avaliação de alterações comportamentais e cognitivas

A atividade locomotora e alterações comportamentais e cognitivas foram analisadas por meio de testes padronizados: campo aberto, *footprint*, nado forçado,, *marble burying*, labirinto em cruz e labirinto em y. Um fluxograma com o *workflow* dos testes e análises realizados durante esse trabalho estão expostos no esquema na figura 4. Esses parâmetros foram registrados por um *software* de captura e rastreamento de imagens EthoVision XT (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

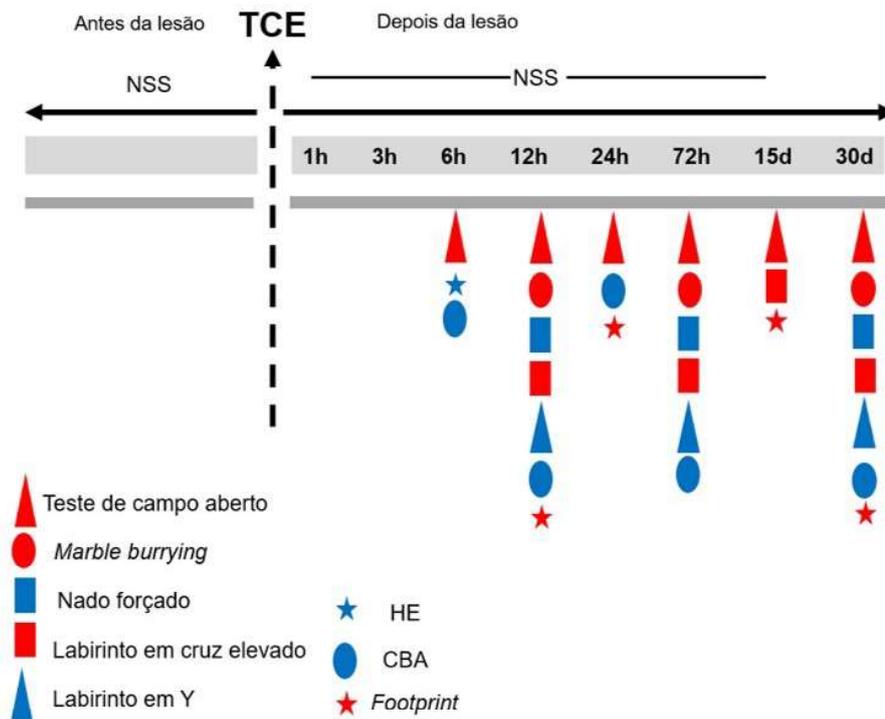


Figura 4. Esquema com fluxograma mostrando o workflow dos testes de comportamento e análises utilizados nesse estudo.

Avaliação Neurológica pelo escore de gravidade neurológica - NSS

Uma hora após o trauma, os camundongos foram avaliados por meio do escore neurológico de gravidade (*Neurological severity escale* - NSS). Trata-se de uma escala de avaliação comportamental bastante utilizada para avaliar o estado neurológico geral de camundongos no TCE experimental. A NSS foi realizada em um circuito de distintos aparatos específicos, conforme previamente descrito por Flierl *et al.*, 2009. Ela é constituída por 10 testes que analisam a resposta do animal a desafios locomotores, de exploração e de resposta a diferentes estímulos (figura 5). A NSS também foi realizada após 3, 6, 12 e 24 horas, e diariamente ao longo de 14 dias. Para cada atividade não

realizada o animal recebeu 1 ponto, e, dessa maneira, quanto maior a pontuação, maior a lesão neurológica apresentada.

-
1. Presença de paresia
 2. Inabilidade em andar em linha reta
 3. Perda do comportamento exploratório
 4. Falha em sair do círculo (até 3 min)
 5. Inabilidade em andar na trave de 3 cm (até 2 min)
 6. Inabilidade em andar na trave de 2 cm (até 2 min)
 7. Inabilidade em andar na trave de 1 cm (até 2 min)
 8. Inabilidade em se equilibrar na trave 0,7 cm (até 10 s)
 9. Inabilidade em se equilibrar na trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)
 10. Perda do reflexo de sobressalto
-

Figura 5. Parâmetros do Escore neurológico de gravidade (NSS)

Teste do Campo aberto

O teste do Campo Aberto foi utilizado para avaliar tanto a atividade locomotora quanto o comportamento do tipo ansioso dos animais. Espera-se em roedores que, em função do hábito exploratório, circulem por toda a arena, incluindo o centro (figura 6A). Animais ansiosos tenderão a se manter na borda (Podhorna e Brown, 2002). O teste foi realizado em todos os animais, incluindo os controles, obedecendo a distribuição dos grupos.

Para aquisição dos dados do Campo Aberto foi utilizado gaiolas do tipo *Phenotyper*, que consistem em uma arena com paredes opaca (30 cm X 30cm). Foram criadas zonas de centro e borda pelo software. Cada gaiola continha uma unidade superior com um vídeo digital, câmera e luzes infravermelhas. Com quatro gaiolas de análises do teste na sala de comportamento, foi possível a realização do teste individualmente com 4

camundongos ao mesmo tempo. A distância total percorrida (cm) foi adquirida pelo software de rastreamento de vídeo *EthoVision* (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). Para iniciar o teste, cada camundongo foi colocado no centro da arena para observação de sua locomoção livre durante 30 minutos. Parâmetros como atividade de locomoção, número de entradas no centro da arena e porcentagem de tempo gasto neste local (medida da ansiedade) foram registrados pelo software *EthoVision*. A locomoção ou atividade locomotora dos animais foi definida pela distância total percorrida (cm) durante o tempo do teste (30 minutos). A medida da ansiedade é a porcentagem de entradas e de tempo gasto no centro da arena (tempo ou entradas no centro da arena/tempo ou entradas no centro e na periferia da arena X 100), sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade.

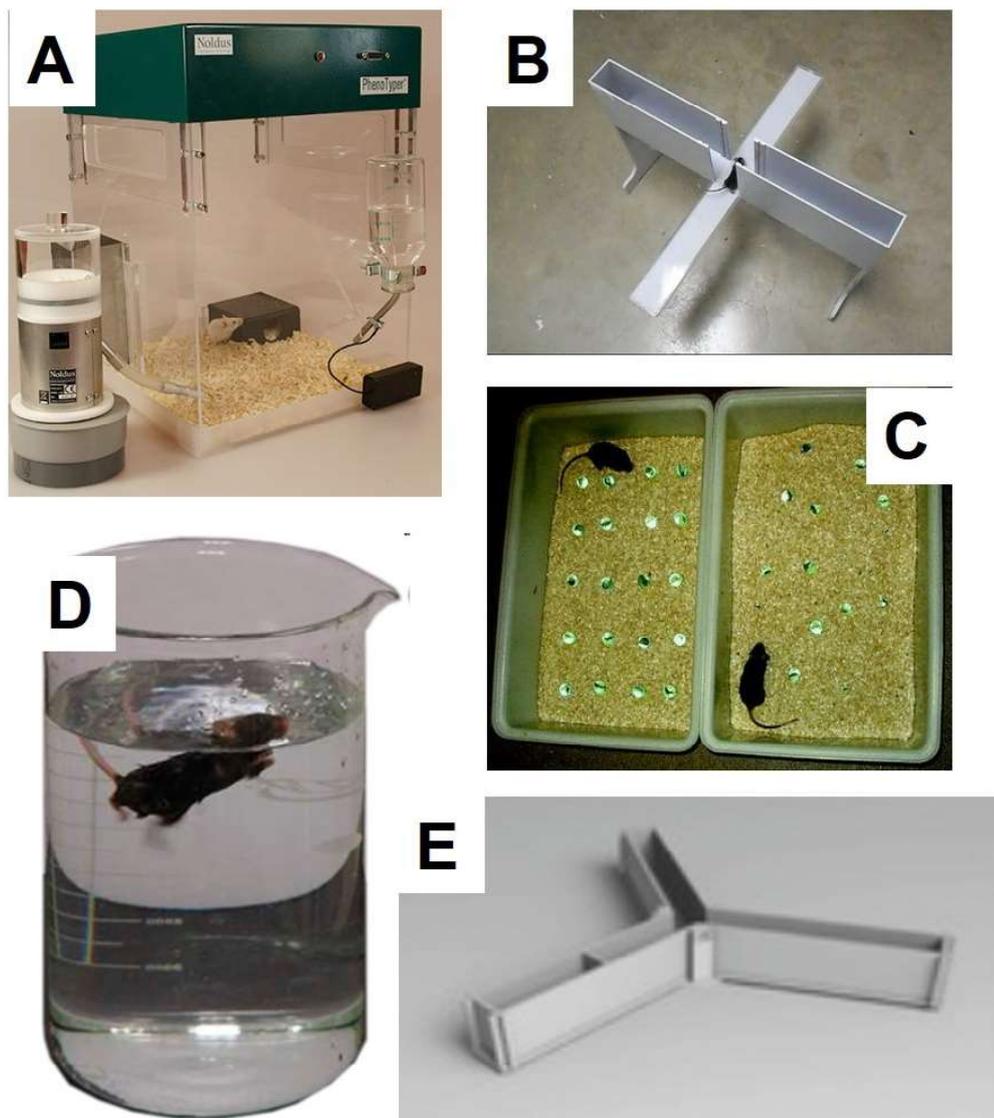


Figura 6. Esquema mostrando os testes de comportamento e cognição utilizados. A- Teste de campo aberto; B – Teste do Labirinto em cruz elevado; C – Teste do marble burying; D – Teste do Nado Forçado e E – Teste do Labirinto em Y.

Teste de *Footprint*

O teste de *footprint* é um teste de avaliação locomotora que faz a análise da marcha do animal utilizando o padrão de pegadas (Carter *et al.*, 1999). O animal foi colocado sobre 4 patas em um recipiente com tinta atóxica colorida, e, logo em seguida, transferido para caminhar por uma plataforma plana, revestida com papel quadriculado (45x15x6

cm). Depois o animal foi retirado da plataforma e colocado novamente na gaiola. O rastro de pegadas que ficou pintado no papel quadriculado foi analisado considerando a média de 3 pegadas, levando em conta a distância em cm do centro de uma pegada para a outra. A análise foi feita do lado da lesão e do lado contralateral.

Teste de labirinto em cruz elevado

Constitui um dos principais testes para avaliação da ansiedade em camundongos, sendo considerado um método válido de investigação comportamental. Tem como base o conflito entre o desejo de explorar novos ambientes e o medo de áreas abertas e desconhecidas, além da associação de elementos ansiogênicos tais como elevação e iluminação (Malkesman *et al.*, 2013).

O aparato de teste foi composto por dois braços abertos (30 cm x 7 cm x 0,25cm) opostos a dois braços fechados (30cm x 7cm x 15cm), e elevados a 60 cm do chão (feitos de plástico cinza escuro) (figura 6B). No início do teste, cada camundongo foi colocado na área central do aparelho com a cabeça voltada para um braço aberto. A duração da sessão de teste foi de 5 min. O software EthoVision XT (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) foi utilizado para análise comportamental. Foram calculados o número de entradas e o tempo gasto em braços abertos e fechados. A porcentagem de tempo gasto em braços abertos e porcentagem de entradas de braço aberto foram usadas como medidas do índice de ansiedade, como descrito anteriormente (Malkesman *et al.*, 2013).

Teste de *Marble burying*

O teste de *marble burying* avalia o comportamento do tipo impulsivo/compulsivo. Foram utilizadas gaiolas do tipo Phenotyper preenchidas com 12 cm de maravalha limpa. Sobre a superfície da maravalha foram colocadas 25 bolinhas de gude de 1 cm e com espaço entre elas de aproximadamente 3 cm. Os animais foram colocados individualmente nas gaiolas por 30 minutos (figura 6C). Foi contabilizado visualmente o número de bolinhas enterradas com 2,5 cm de profundidade. O maior número de bolinhas enterradas corresponde ao comportamento do tipo impulsivo/compulsivo (Bahi e Dreyer, 2012).

Teste de nado forçado

Este teste foi realizado para a detecção de comportamentos do tipo depressivo (Häring *et al.*, 2013). Para o teste do nado forçado, os animais foram colocados individualmente em um recipiente de vidro transparente preenchido com 10 cm de água na temperatura de 23-25°C. A sessão teve duração total de 6 minutos, sendo os primeiros 2 minutos de pré-teste seguido pelo teste de 4 minutos (figura 6D). O tempo de imobilidade foi registrado e, posteriormente, analisado por um software de rastreamento (EthoVision XT, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA), o qual considerou o animal imóvel quando estava com sua velocidade abaixo de 5cm/s com o objetivo de desconsiderar o tempo em que o animal estava apenas boiando.

Teste de Labirinto em Y

Para analisar a memória de trabalho, foi utilizado o comportamento de alternância espontânea de uma única sessão do labirinto em Y (Lazaroni *et al.*, 2012). Cada camundongo foi posicionado num braço inicial (A) livre para mover-se pelos outros braços do labirinto durante 5 min (figura 6E). A série de entradas em cada braço foi visualmente analisada. A alternância é definida como sucessivas entradas nos 3 diferentes braços. O número de sequências de entradas (ABC, BCA) foi definido como o número de alterações. A porcentagem da alternância foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $[\text{total de alternância} / (\text{total de entradas nos braços} - 2) \times 100]$.

É necessário lembrar que antes de todos os testes os animais foram ambientados na sala de comportamento por, no mínimo, 30 minutos. No teste de campo aberto, todos os grupos participaram. No entanto, em função da lesão locomotora presente com 6 e 24 horas, esses grupos foram excluídos dos outros testes de comportamento que dependiam de locomoção. O teste de *footprint* foi realizado com os grupos de 12 e 24 horas, 15 e 30 dias. O teste de Labirinto em cruz foi realizado com os grupos de 12 e 72 horas, 15 e 30 dias. E os testes de *marble burying*, nado forçado e labirinto em y foram realizados com os grupos de 12 e 72 horas, e 30 dias após o TCE. Em todos os testes houve grupo controle.

6.5 Medida dos níveis de citocinas pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA)

Após os testes de comportamento, os animais foram anestesiados, e tiveram as regiões do encéfalo retiradas a fresco. Os tecidos foram armazenados em freezer – 70C°

e, em seguida, processadas em tampão de homogeneização para realização de análises pela técnica de CBA. As concentrações, no tecido cerebral (hipocampo, córtex frontal), das citocinas TNF e IL-10 foram avaliadas por meio de Kits Th1/Th2/Th17 de CBA (BD Biosciences, San Diego, CA) de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração dos mediadores inflamatórios foi determinada por leitura no instrumento FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) na Faculdade de Medicina da UFMG.

6.6 Histologia

Para avaliação de alterações estruturais e patológicas após TCE, foram realizadas análises histopatológicas do tecido cerebral. Para tanto, após a realização dos testes de comportamento, os animais que foram selecionados para histologia foram anestesiados com xilazina/cetamina e perfundidos com paraformaldeído a 4% para a retirada do encéfalo via perfusão transcardíaca. A coloração de rotina HE (Hematoxilina-Eosina) foi utilizada para análise das alterações histopatológicas. As lâminas de HE foram cortadas e coradas no Departamento de Patologia – ICB/UFMG.

6.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os resultados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Kolmorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio dos testes estatísticos T de Student (duas variáveis) ou ANOVA

(três ou mais variáveis). O pós-teste de Bonferroni foi utilizado quando necessário para múltiplas comparações. No caso de distribuição não normal, as variáveis foram comparadas por meio dos testes estatísticos Mann-Whitney U (duas variáveis) ou Kruskal-Wallis (três ou mais variáveis). O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Padronização do modelo de TCE

A tabela 1 representa os principais resultados obtidos durante a padronização do modelo de TCE, usando diferentes protocolos. Observa-se que a mortalidade foi o principal parâmetro para determinação da viabilidade do protocolo. Assim como, a mudança no tipo de projétil foi o principal determinante para a redução da mortalidade dos animais. É importante ressaltar que o óbito desses animais ocorreu imediatamente após a indução do TCE.

| Tabela 1 – Evolução de diferentes parâmetros clínicos em distintos protocolos de TCE | | | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Parâmetros avaliados | Protocolo 1 | Protocolo 2 | Protocolo 3 | Protocolo 4 |
| Mortalidade | 62,5% | 60% | 31% | 3% |
| concentração do anestésico salina/xilazina/cetamina | 4/1/3 | 4/1/1 | 8/1/1 | 8/1/1 |
| quantidade do anestésico em µl | 70 µl | 120 µl | 120 µl | 120 µl |

| | | | | |
|--|-------|-------|-------|--------|
| | | | | |
| Tipo de projétil | metal | metal | metal | resina |
| peso do projétil em gramas | 25 g | 20 g | 20 g | 15 g |
| número de ensaios realizados | 2 | 2 | 1 | 5 |
| número de animais utilizados no protocolo | 25 | 19 | 29 | 142 |

A introdução de um novo projétil, realizada no protocolo 4, se fez necessária para a redução de eventos como hemorragia e extravasamento da massa encefálica que ocorriam depois do TCE (tabela 2).

| Tabela 2 – Porcentagem de ocorrência de sinais clínicos após TCE | | |
|---|----------------------------|--------------------|
| Parâmetro avaliado | Protocolos iniciais | Protocolo 4 |
| Hemorragia | 10,44% | 2,98% |
| Protrusão do olho direito | 4,47% | Não há ocorrências |
| Extravasamento de massa encefálica | 5,97% | Não há ocorrências |
| Respiração instável | 2,98% | 0,74% |
| Necessidade de massagem cardíaca | Não há ocorrências | 0,74% |
| Quebra da calota craniana | 2,98% | Não há ocorrências |
| Afundamento da calota craniana | 2,98% | Não há ocorrências |
| Inchaço da calota craniana | 5,97% | Não há ocorrências |

A figura 7 contém imagens macroscópicas da lesão causada pelos dois tipos de projétil utilizados na padronização desse modelo (figura 7A metal; figura 7B resina). Foi possível observar visualmente uma diferença importante no padrão de lesão encefálica dos animais submetidos ao TCE.

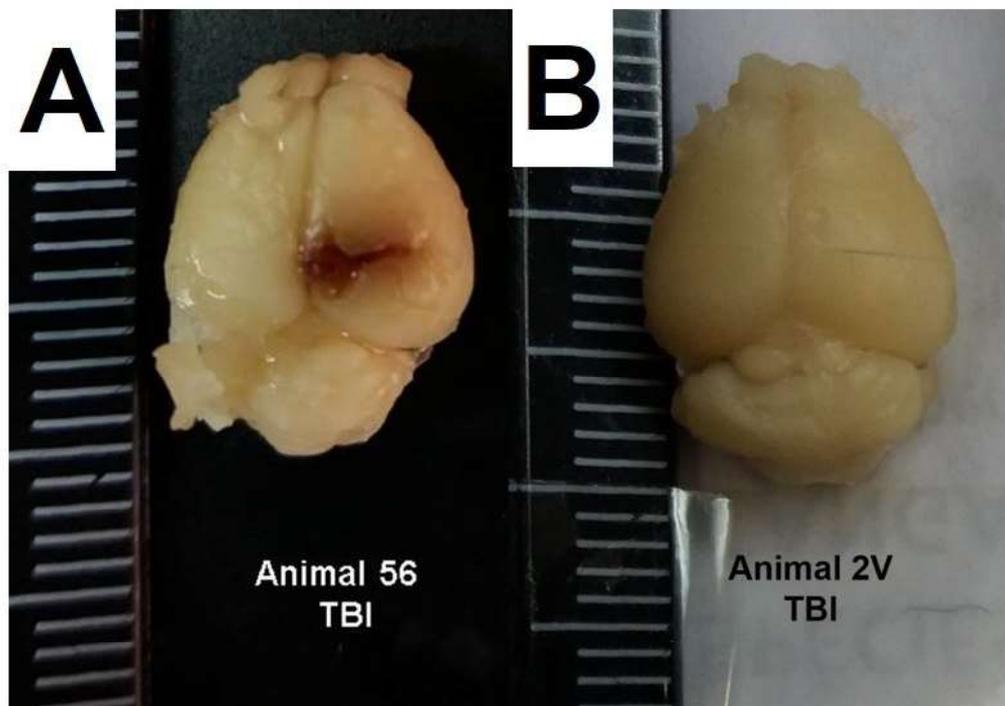


Figura 7. Imagem representativa da análise macroscópica do encéfalo de camundongos submetidos ao TCE com diferentes tipos de projétil. (A) lesão gerada pelo projétil de metal de 25 gramas; (B) lesão gerada pelo projétil de resina de 15 gramas.

7.2 Avaliação neurológica pela escala NSS e da massa corporal após o TCE

A avaliação neurológica foi realizada 1 dia antes da indução do TCE, às 1, 3, 6 e 12 horas e ao longo de 14 dias após a lesão, utilizando a escala NSS. Foi possível observar

que durante as primeiras horas após o TCE, houve lesão neurológica significativa indicada pela alta pontuação na NSS em relação ao grupo controle (figura 8).

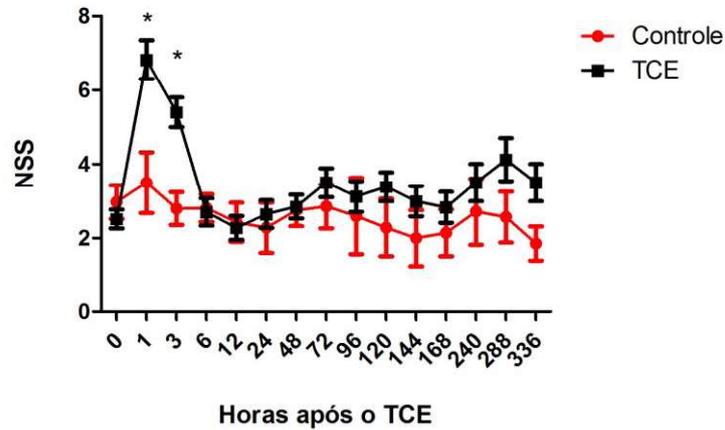


Figura 8. Escores obtidos na escala de avaliação neurológica (NSS) nos tempos 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 288, 336 horas após TCE. * $p < 0,05$ em relação ao controle ($n=10$) que incluiu animais submetidos à lesão fictícia.

Não houve alteração de peso corporal dos animais após o TCE, em comparação com os controles (figura 9).

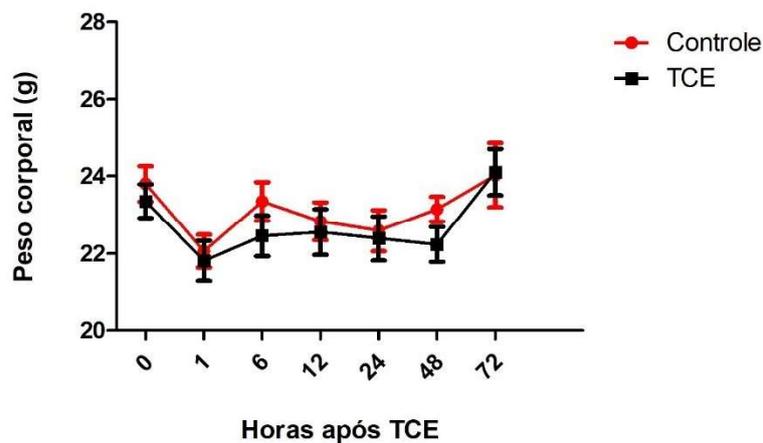


Figura 9. Análise do peso corporal em gramas (g) nos tempos 0, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após TCE. * $p < 0,05$ em relação ao controle ($n=10$) que incluiu animais submetidos à lesão fictícia.

7.3 Avaliação da atividade locomotora após o TCE pelos testes do campo aberto e de footprint

Os animais submetidos ao TCE apresentaram prejuízo na atividade locomotora 6 horas após a lesão, quando comparados com os controles. De forma peculiar, após uma recuperação com 12 horas, esses animais voltaram a apresentar prejuízo locomotor 24 horas depois da lesão, como indicado pela distância total percorrida no teste de campo aberto (figura 10). No teste de *footprint*, não houve alteração da marcha dos animais após o TCE, tanto do lado da lesão quanto do lado contralateral (figura 11).

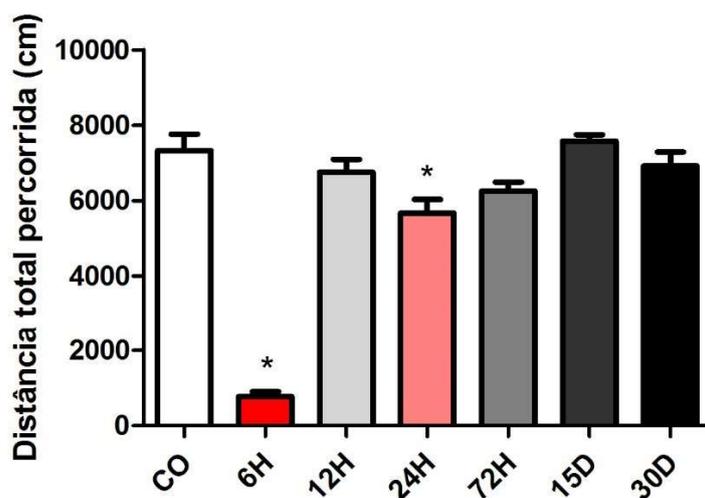


Figura 10. Análise da distância total percorrida em centímetros (cm) pelo teste do campo aberto às 6 (6H), 12 (12H), 24 (24H) e 72 (72H) horas e 15 (15D) e 30 (30D) dias após TCE. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Co, n=10) que incluiu animais submetidos à lesão fictícia.

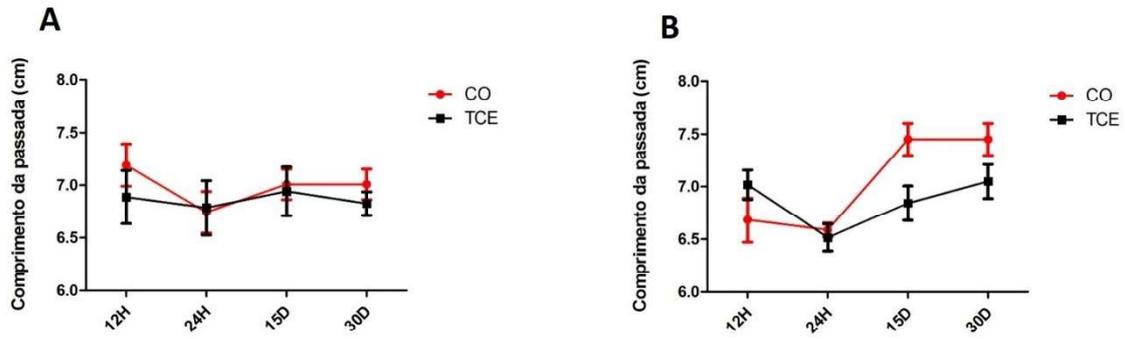


Figura 11. Análise do teste de *footprint* às 12 (12H) e 24 (24H) horas e 15 (15D) e 30 (30D) dias após TCE. (A) Comprimento da passada do lado contralateral (cm) ao TCE. (B) Comprimento da passada do lado ipsilateral (cm) ao TCE. $p > 0,05$ para todas as comparações. O grupo controle (n=10) incluiu animais que receberam lesão fictícia.

7.4 Caracterização de alterações comportamentais e cognitivas após o TCE

7.4.1 Análise do comportamento do tipo ansioso

Os animais permaneceram uma proporção de tempo menor nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos animais controles às 12 e 72 horas, 15 e 30 dias após a indução do TCE, o que indica um comportamento do tipo ansioso (figura 12).

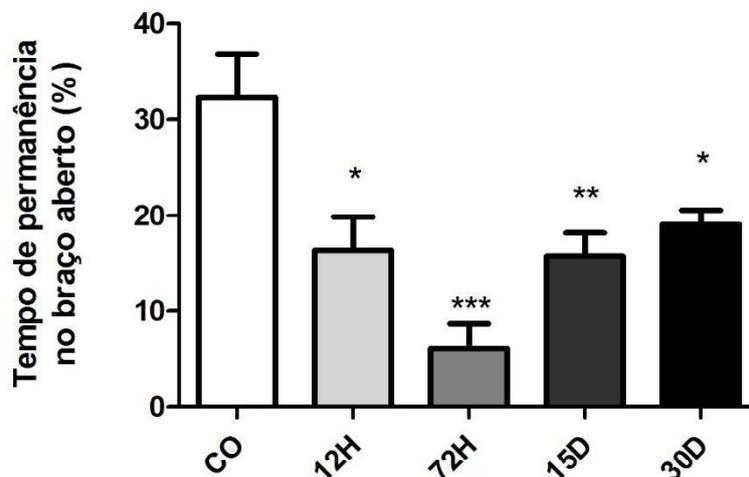


Figura 12. Análise do percentual (%) de tempo de permanência no braço aberto do teste de labirinto em cruz elevado às 12 (12H) e 72 (72H) horas e 15 (15D) e 30 (30D) dias após TCE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (CO, n=10) que incluiu animais submetidos à lesão fictícia.

Os dados apresentados nas figuras 13 e 14 representam os resultados da avaliação de parâmetros de ansiedade nos testes do campo aberto e *marble burying*. Não foi possível detectar alteração de comportamento nas fases aguda (12 e 72 horas) e subaguda (15 e 30 dias) após TCE por meio desses testes.

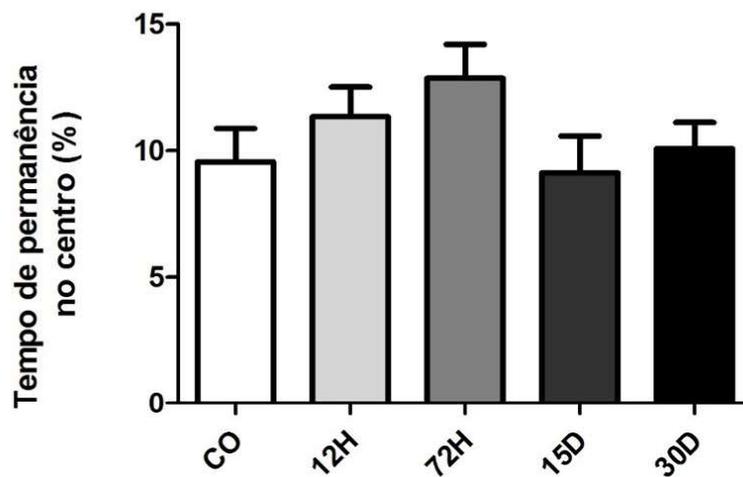


Figura 13: Análise do percentual (%) de tempo de permanência no centro pelo teste de campo aberto às 12 (12H) e 72 (72H) horas e 15 (15D) e 30 (30D) dias após TCE. $p > 0,05$ para todas as comparações. O grupo controle (CO, n=10) incluiu animais que receberam lesão fictícia.

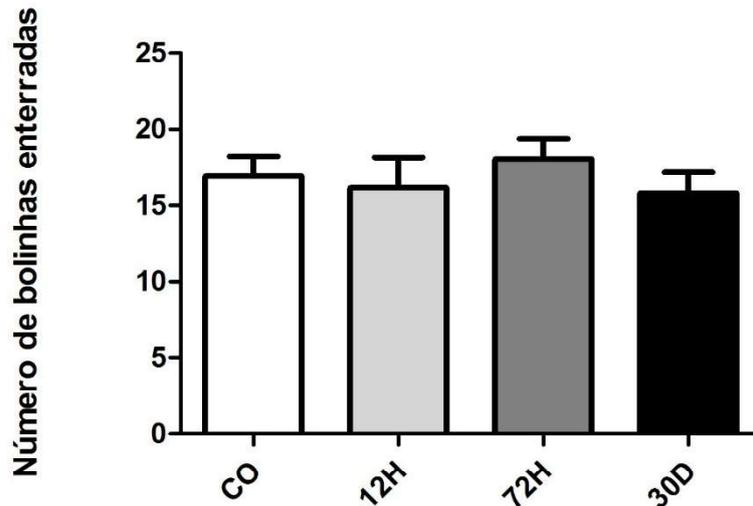


Figura 14: Análise do número de bolinhas enterradas pelo teste de *marble burying* às 12 (12H) horas, 72 (72H) e 30 (30D) dias após TCE. $p > 0,05$ para todas as comparações. O grupo controle (Co, n=10) incluiu animais que receberam lesão fictícia.

7.4.2 Análise do comportamento do tipo depressivo

No teste de nado forçado, não houve diferença no tempo de imobilidade dos animais após o TCE em relação ao grupo controle. Contudo, houve diferença significativa no tempo de escalada no grupo de 72 horas após o TCE, em relação ao controle, que pode ser um indício do comportamento do tipo depressivo (figura 15).

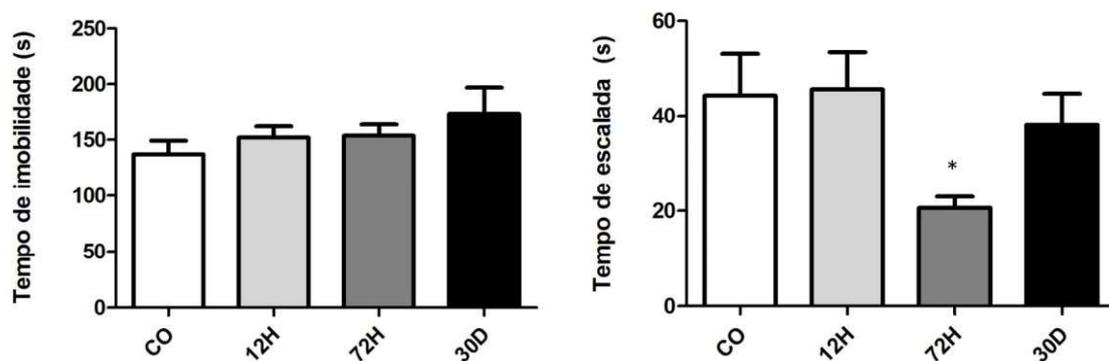


Figura 15: Análise do teste de nado forçado no grupo controle (CO) e às 12 (12H) horas, 72 (72H) horas e 30 (30D) dias após TCE. (A) Tempo de imobilidade em segundos (s) $p > 0.05$ para todas as comparações; (B) Tempo de escalada em segundos (s) * $p < 0.05$ em relação na ao grupo controle (CO, n=10 que incluiu animais que receberam lesão fictícia).

7.4.3 Análise de alterações cognitivas

Não houve alteração cognitiva nos animais submetidos ao TCE, avaliada pela ausência de diferença na proporção da taxa de alteração espontânea entre os braços no teste do labirinto em Y (figura 16).

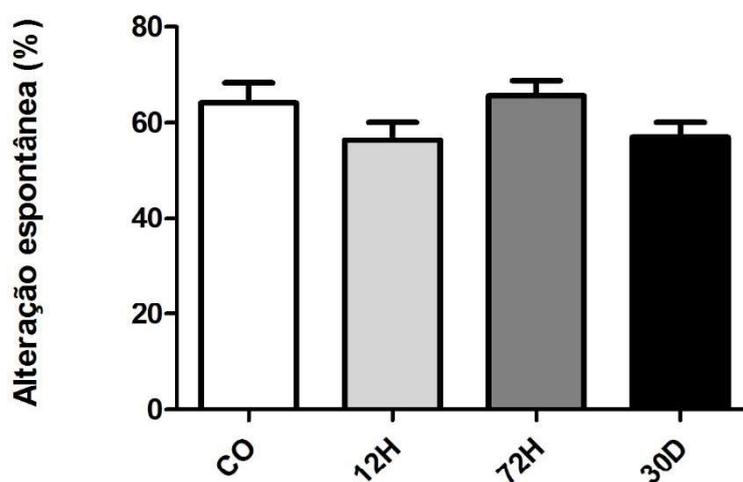


Figura 16. Análise do percentual (%) de alteração espontânea no teste de labirinto em Y às 12 (12H) horas, 72 (72H) horas e 30 (30D) dias após TCE. $p > 0,05$ para todas as comparações. O grupo controle (CO, n=10) incluiu animais que receberam lesão fictícia.

7.5 Caracterização de alterações morfológicas em diferentes regiões do encéfalo de camundongos da linhagem C57Black6 após o TCE

Foi encontrada infiltração de neutrófilos e hemorragia local no córtex cerebral às 6 horas após o TCE, como mostrado pela imagem microscópica representativa, com aumento de 100 vezes, e corada por HE (figura 17).

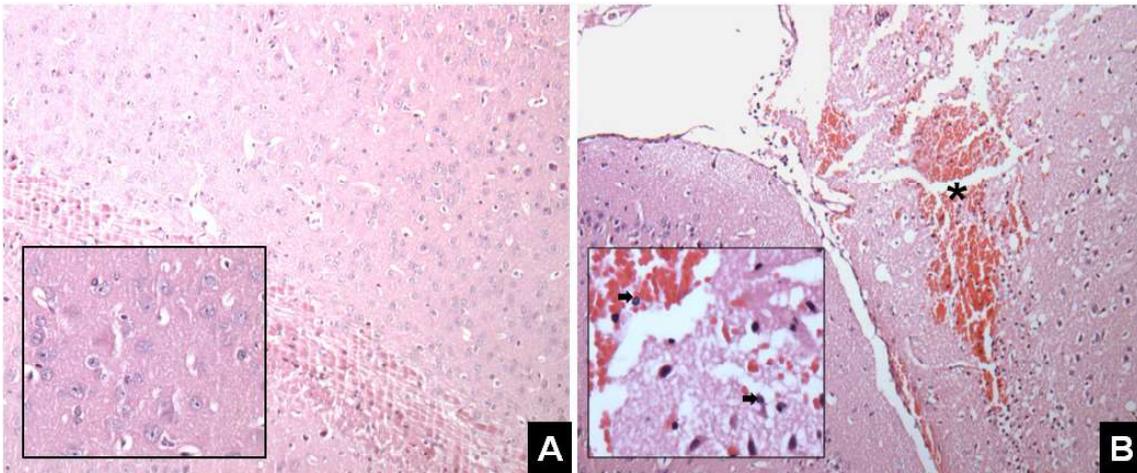


Figura 17. Fotomicrografias representativas de seções do cérebro coradas com H&E. A – Cérebro de animal controle mostrando ausência de alterações no tecido cerebral. B – Cérebro de animal submetido ao TCE mostrando hemorragia focal (asterisco) e infiltração de neutrófilos no córtex cerebral. Observe alguns neutrófilos (setas) e numerosas células isquêmicas envolvidas na cavidade hemorrágica, 6 horas após o TCE. O grupo controle (n=3) incluiu animais submetidos à lesão fictícia. Ampliação: A-B: × 100; Inserção: × 400.

7.6 Avaliação do processo inflamatório via análise dos níveis de citocinas em distintas porções do encéfalo de camundongos machos da linhagem C57Black6 submetidos ao TCE

7.6.1 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF) no córtex pré-frontal

Nossos resultados mostraram que não houve alteração nas concentrações de TNF no lado ipsilateral ao TCE (figura 18A). Entretanto, houve uma diminuição dos níveis de TNF no córtex contralateral às 72 horas e 30 dias após o TCE em relação ao grupo controle (figura 18B).

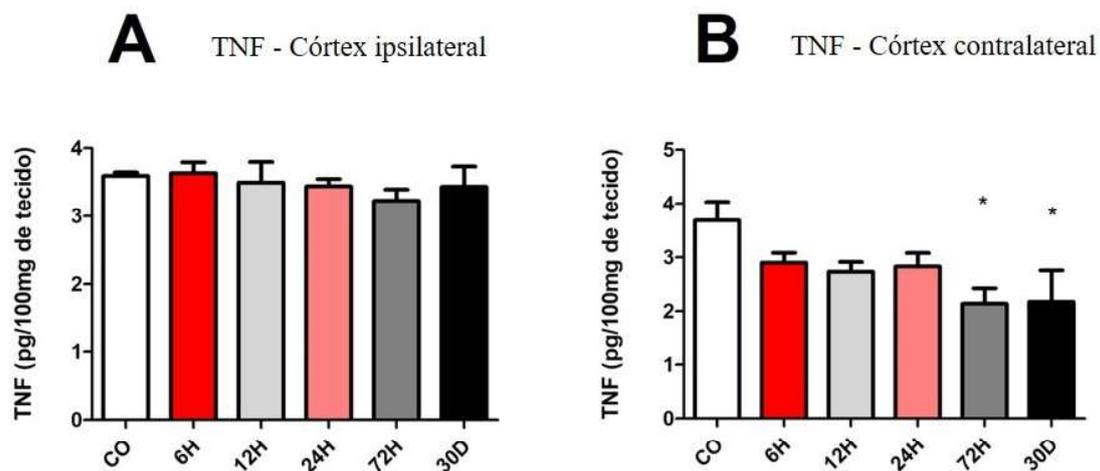


Figura 18. Concentrações de fator de necrose tumoral (TNF) expressas em picograma (pg) por 100 miligramas (mg) de tecido no córtex de animais submetidos ao TCE nos tempos 6 (6H), 12 (12H), 24 (24h) e 72 (72H) horas e 30 dias após o trauma e em animais submetidos à lesão fictícia (grupo controle, CO, n=5). e controles. A: córtex ipsilateral; B: córtex contralateral. *p<0.05 em relação ao grupo controle.

7.6.2 Concentração de TNF no hipocampo

Houve aumento dessa citocina as 12 e 72 horas no hipocampo ipsilateral após a lesão, em comparação com o grupo de 30 dias (figura 19A). Em relação ao hipocampo contralateral, houve aumento dos níveis de TNF as 6, 12 e 24 horas em relação ao grupo de 30 dias e diminuição de TNF aos 30 dias quando comparado com os controles (figura 19B).

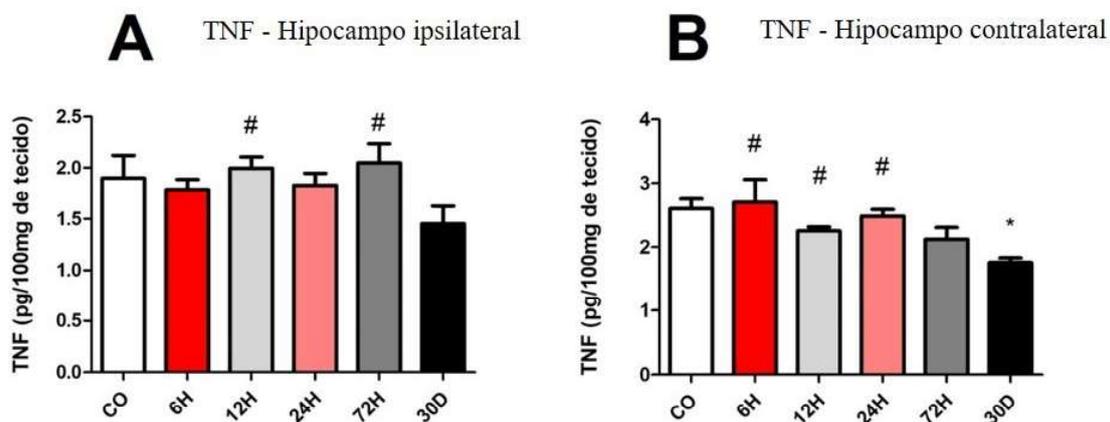


Figura 19. Concentrações de fator de necrose tumoral (TNF) expressas em picograma (pg) por 100 miligramas (mg) de tecido no hipocampo de animais submetidos ao TCE nos tempos 6 (6H), 12 (12H), 24 (24h) e 72 (72H) horas e 30 dias após o trauma e em animais submetidos à lesão fictícia (grupo controle, CO, n=5). A: Hipocampo ipsilateral; B: hipocampo contralateral *p<0.05 em relação ao grupo controle e # p<0,05 em relação ao grupo de 30 dias.

7.6.3 Concentração de interleucina (IL)-10 no córtex pré-frontal

Houve aumento na concentração de IL-10 às 12 e 24 horas após o TCE no córtex ipsilateral ao trauma em relação ao grupo controle (figura 20A). Entretanto, no córtex contralateral os níveis dessa citocina se encontraram diminuídos às 72 horas e aos 30 dias em relação ao grupo controle. Ainda nessa região, foi verificado aumento dessa citocina às 6 e 12 horas em relação às 72 horas e aos 30 dias após o TCE. Houve também e aumento às 24 horas após o TCE em relação às 6 horas (figura 20B).

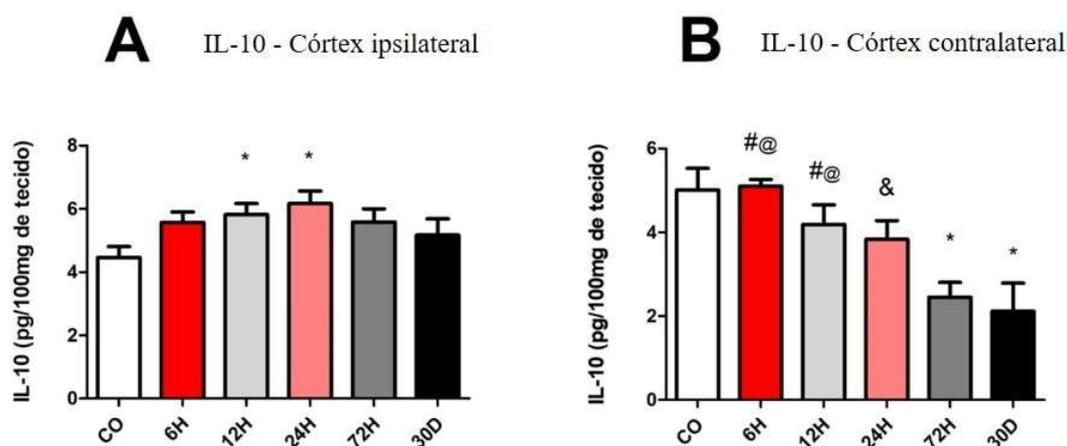


Figura 20. Concentrações de interleucina (IL)-10 expressas em picograma (pg) por 100 miligramas (mg) de tecido no córtex cerebral de animais submetidos ao TCE nos tempos 6 (6H), 12 (12H), 24 (24h) e 72 (72H) horas e 30 dias após o trauma e em animais submetidos à lesão fictícia (grupo controle, CO, n=5). A: Córtex ipsilateral; B: Córtex contralateral * p<0,05 em relação ao controle, # p<0,05 em relação ao grupo de 30 dias, @ p<0,05 em relação ao grupo de 72 horas e & p<0.05 em relação ao grupo de 6 horas.

7.6.4 Concentração de IL-10 no hipocampo

No hipocampo ipsilateral houve diminuição dos níveis de IL-10 as 72 horas depois da lesão (figura 21A). No hipocampo contralateral essa diminuição foi demonstrada as 6, 24 e 72 horas, e 30 dias após o TCE (Figura 21B).

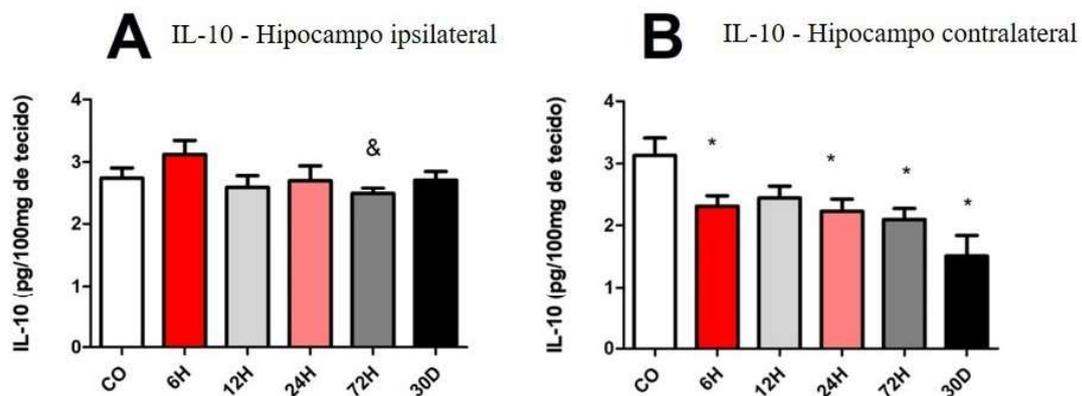


Figura 21. Concentrações de interleucina (IL)-10 expressas em picograma (pg) por 100 miligramas (mg) de tecido no hipocampo de animais submetidos ao TCE nos tempos 6 (6H), 12 (12H), 24 (24h) e 72 (72H) horas e 30 dias após o trauma e em animais submetidos à lesão fictícia (grupo controle, CO, n=5). A: Hipocampo ipsilateral; B: Hipocampo contralateral * $p < 0,05$ em relação ao controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo de 6 horas.

8. DISCUSSÃO

O TCE leve tem a maior prevalência dentre os tipos de trauma, podendo representar até 90% dos casos de TCE em algumas populações (Feigin *et al.*, 2013). Além disso, o TCE leve tem sido associado a diversas sequelas comportamentais e neuropsiquiátricas, como irritabilidade, distúrbios de sono, ansiedade e depressão (Deb *et al.*, 1998; Deb *et al.*, 1999). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo padronizar o modelo de queda de peso em camundongos para investigar alterações comportamentais e cognitivas na fase aguda e subaguda do TCE leve. Bem como, analisar alterações morfológicas e parâmetros inflamatórios em diferentes regiões do SNC, associando-as a sequelas comportamentais e cognitivas após o TCE.

Durante a padronização, a mudança do tipo de projétil foi o principal parâmetro responsável por reduzir a mortalidade dos animais. Apesar de o trauma gerado ter um ponto focal inicial, na região parietal direita, a lesão nesse trabalho foi majoritariamente difusa (Marmarou *et al.*, 1994), atingindo grande parte do córtex cerebral. Alguns trabalhos usando esse mesmo modelo também encontraram lesão no córtex cerebral (Schwarzbold *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

De acordo com Tsenter e colaboradores (2008), a pontuação do animal na escala NSS realizada 1 hora após o TCE define a gravidade do trauma. O TCE leve corresponde a um valor menor que 5, moderado de 5 a 6, grave de 7 a 8 e fatal de 9 a 10 pontos. No nosso trabalho, a pontuação dos animais na escala NSS realizada 1 hora após o TCE foi por volta de 6 pontos, o que segundo essa classificação é correspondente a um TCE moderado. Entretanto, outros parâmetros importantes para definição da gravidade do trauma tais como a taxa de sobrevivência e o estado clínico dos animais após a lesão foram compatíveis com TCE leve. Além disso, a baixa taxa de mortalidade, a preservação do

peso corporal e o rebaixamento da pontuação na NSS de 6 para 2 pontos após 6 horas da lesão mostraram que nosso modelo de queda de peso em camundongos produziu um TCE leve nos animais.

O presente trabalho é o primeiro a investigar a atividade locomotora por meio do teste de campo aberto 6 e 12 horas após o TCE leve. Na fase aguda do TCE leve em humanos, os principais sintomas não têm associação com locomoção, e sim com aspectos somáticos, cognitivos e afetivos, como presença de irritabilidade, fadiga e distúrbios de sono (Prince e Bruhns, 2017). Nesse cenário, pode-se especular que o prejuízo locomotor às 6 horas esteja diretamente relacionado com o início da infiltração de neutrófilos, mas, principalmente, com mecanismos de lesão primária, como o edema cerebral, que se desenvolve nas primeiras horas após a ocorrência do trauma (McKee e Daneshvar, 2015). Além disso, a recuperação às 12 horas pode estar associada a uma possível diminuição do edema cerebral.

De maneira interessante, houve uma redução da locomoção às 24 horas após a lesão, que poderia estar relacionada com o início dos mecanismos relacionados à lesão secundária. Não foi possível realizar testes de comportamento 6 e 24 horas após o TCE, porque a atividade locomotora preservada é condição essencial para execução dos testes (Schwarzbold *et al.*, 2010). Essa diminuição da locomoção também foi encontrada em outros trabalhos que utilizaram o modelo de queda de peso, que avaliaram às 24 horas, 7 dias e 4 semanas após o TCE (Koob *et al.*, 2008; Fromm *et al.*, 2004 e O'Connor *et al.*, 2003). Além disso, no presente estudo, houve recuperação do prejuízo motor 72 horas após o TCE que perdurou por 30 dias após a lesão. Diferindo de nossos dados, Schwarzbold e colaboradores (2010) encontraram maior locomoção no mesmo modelo 10 dias após o TCE. Quando comparado com o modelo de ICC, utilizado na maior parte

dos trabalhos que analisou locomoção, foi encontrado aumento da atividade locomotora, com variação do tempo de análise de 1 dia até 14 dias após a lesão (Pandey *et al.*, 2009; Wakade *et al.*, 2010; Kimbler *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012 e Budinich *et al.*, 2013). Esses dados sugerem que as características intrínsecas dos diferentes modelos, variação nos testes utilizados para avaliar a locomoção, bem como o momento de avaliação, podem ser responsáveis por diferenças observadas entre os resultados relativos à locomoção nos estudos.

Tem sido relatada, com cada vez mais frequência, alterações de marcha em pacientes que sofreram TCE, principalmente do tipo grave (Niechwiej-Szwedo *et al.*, 2007; Walker e Pickett, 2007). Nesse trabalho, não foi encontrada nenhuma alteração de marcha, usando o teste de *footprint*. Contudo, Bose e colaboradores (2013), estudando espasticidade muscular após TCE grave por queda de peso em ratos da linhagem Sprague-Dawley, encontraram alteração de marcha às 2 e 4 semanas após a lesão. Usando o mesmo modelo de TCE, foi encontrada alteração de marcha 1.5, 6 e 24 horas depois do TCE, em um estudo que investigou o tratamento farmacológico para déficits motores em camundongos da linhagem CF-1 (Costa *et al.*, 2009). Os estudos utilizaram parâmetros mais sensíveis para a análise da marcha, como o índice de alternância e aqueles que relataram a gravidade do TCE encontraram alteração de marcha no TCE grave, o que pode, pelo menos em parte, explicar os resultados aparentemente conflitantes.

Ressalta-se que o comportamento do tipo ansioso foi detectado pelo teste de labirinto em cruz elevada 12 horas após o TCE e persistiu até 30 dias após a lesão. Esses dados corroboram achados de estudos em humanos em que a ansiedade pode estar presente logo após, semanas ou, até mesmo, 10 anos após o TCE (Baker-Color *et al.*, 2015; Osborn *et al.*, 2017; Baker-Color *et al.*, 2018; Hammond *et al.*, 2019). Alguns

estudos pré-clínicos também dão suporte aos nossos resultados referentes à presença de ansiedade. Shultz e colaboradores (2012), encontraram comportamento do tipo ansioso 24 horas e que se manteve ao longo de 8 semanas em ratos Long Evans submetidos ao modelo de PLF repetitiva. Utilizando o modelo de queda de peso, Schwarzbald e coautores (2010) mostraram comportamento do tipo ansioso em camundongos Swiss 11 dias após o trauma. Entretanto, com o mesmo modelo, foi encontrada redução da ansiedade em ratos Wistar 14 dias depois do TCE (Pandey *et al.*, 2009). Washington e colaboradores (2012) também encontraram redução da ansiedade 21 dias depois do TCE em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de ICC. Dessa forma, a linhagem, o modelo de TCE, os instrumentos utilizados e o momento de realização dos testes podem ter ocasionado os diferentes resultados nos estudos em relação ao comportamento do tipo ansioso.

Poucos estudos de trauma utilizaram o teste de *marble burying* para analisar o comportamento do tipo impulsivo/compulsivo (TIC). Diferentemente do nosso resultado, foi encontrado aumento no número de bolinhas enterradas (medida de comportamento TIC) em ratos Wistar 14 dias após o TCE pelo modelo de queda de peso (Pandey *et al.*, 2009). Também foi observado o aumento de esferas enterradas, em relação ao controle, em camundongos C57BL/6, 7 dias após o TCE pelo modelo ICC (Tucker *et al.*, 2017). Os motivos desses resultados conflitantes no teste de *marble burying* podem estar relacionados ao uso de diferentes modelos de TCE e de espécies e linhagens distintas de animais.

Em relação ao comportamento do tipo depressivo, não foi detectada diferença no tempo de imobilidade, contudo houve diferença no tempo de escalada. O tempo de escalada não é uma avaliação que tem sido utilizada em modelos de TCE. Entretanto,

trata-se de uma avaliação previamente utilizada na literatura para caracterização do comportamento do tipo depressivo (Vieira *et al.*, 2008). O surgimento do comportamento do tipo depressivo no pico da lesão secundária foi bem semelhante ao que se observa em pacientes com TCE, que apresentam oscilações entre estados de ansiedade e depressão (Baker-Solo *et al.*, 2015; Osborn *et al.*, 2017). A análise do tempo de imobilidade no nado forçado foi realizada em alguns estudos pré-clínicos (Taylor *et al.*, 2006; Washington *et al.*, 2012). Milman e colaboradores (2005) encontraram comportamento do tipo depressivo em camundongos da linhagem CD-1 (Charles River Laboratories) submetidos ao modelo de queda de peso aos 7 e 90 dias após a lesão. Usando o mesmo modelo e a mesma linhagem de camundongos, foi encontrado comportamento do tipo depressivo 72 horas após o trauma (Tweedie *et al.*, 2007). Corroborando com nossos dados de imobilidade, outros trabalhos que analisaram essa medida também não encontraram diferença significativa aos 10 dias, 1 e 6 meses após a lesão em diferentes modelos de TCE. Em síntese, mais estudos são necessários para determinar o efeito do TCE no desenvolvimento de depressão em roedores, utilizando o teste de nado forçado.

Em relação ao teste de labirinto em y para análise da memória espacial, não houve alteração cognitiva no nosso grupo experimental. Esse achado difere de resultados obtidos em pacientes vítimas de TCE com gravidades variáveis, que foram avaliados através de testes de *Wechsler Adult Intelligence Scale* nos quais foram detectadas declínio cognitivo após 3 décadas de lesão (Himanen *et al.*, 2006). Bem como, pesquisas experimentais também têm demonstrado déficits cognitivos com a utilização desse teste. Utilizando o modelo de queda de peso e camundongos da linhagem CD-1 foram encontrados prejuízos cognitivos aos 7 (Rubovitch *et al.*, 2015) e aos 10 dias (Heim *et al.*, 2017) após o TCE.

Benady e colaboradores (2018), usando o mesmo modelo e linhagem de camundongos, mostrou alteração aos 7 dias, que se manteve aos 30 dias após o TCE.

No presente estudo, a infiltração de neutrófilos 6 horas após o TCE e os resultados da análise de citocinas ofereceram evidências de que há relação entre esses mediadores e o desenvolvimento da ansiedade e depressão nos camundongos submetidos ao modelo de queda de peso. O TNF é uma citocina pró-inflamatória que está presente em neurônios e células da glia (Curls *et al.*, 1997). Nesse trabalho, houve redução dos níveis de TNF no córtex contralateral 72 horas após o TCE em relação ao grupo controle. Por outro lado, não foram detectadas diferenças nas concentrações de TNF no córtex ipsilateral em nenhum dos tempos estudados em comparação ao grupo controle. Há poucos trabalhos que investigaram citocinas no TCE leve. O achado do presente estudo é contrário ao relatado por Taupin e colaboradores (1993), que detectaram aumento das concentrações de TNF na mesma região, às 3 e 8 horas após o TCE por PLF. Por outro lado, corroborando o nosso achado, Knobloch e colaboradores (1999) não encontraram diferença na concentração de TNF no córtex ipsilateral usando o modelo de ICC.

Os diferentes trabalhos na literatura, tanto clínicos quanto experimentais (Csuka *et al.*, 1999; Dalgard *et al.*, 2012), têm mostrado que o TNF tem sua concentração aumentada na fase aguda do TCE grave, e uma regulação negativa em longo prazo. Esse padrão, que parece estar bem estabelecido no TCE grave, não se repetiu nos nossos dados, usando um modelo de TCE leve. De forma interessante, os resultados desse trabalho mostraram que houve redução significativa da concentração de TNF 30 dias após o TCE no córtex e hipocampo contralateral em relação ao grupo controle.

Neste trabalho também foi avaliada a concentração da IL-10 no córtex cerebral e no hipocampo. A IL-10 inibe citocinas pró-inflamatórias como TNF e estimula a síntese

de citocinas anti-inflamatórias, sendo importante na fase de resolução da inflamação (Curfs *et al.*, 1997). Houve aumento significativo das concentrações de IL-10 às 12 e 24 horas após o TCE no córtex ipsilateral em relação ao grupo controle. Esses dados estão de acordo com estudo anterior que relatou aumento das concentrações dessa citocina 4 e 24 horas após TCE induzido por PLF (Knoblach e Faden, 1998). Também há poucos estudos com TCE leve que investigaram essa citocina, bem como trabalhos que separaram as regiões do cérebro em ipsilateral e contralateral para as análises. Alguns estudos clínicos com TCE grave mostraram aumento dessa citocina em diferentes momentos, desde 2 horas até 6 meses após a lesão (Woiciechowsky *et al.*, 2002; Shiozaki *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2011). Ressalta-se ainda que houve redução significativa das concentrações de IL-10 em relação ao controle, no lado contrário ao da lesão nas duas regiões do cérebro que foram analisadas. No córtex contralateral, a redução de IL-10 ocorreu às 72 horas e se manteve até 30 dias após o TCE. No hipocampo contralateral, essa redução foi detectada em todos os tempos testados, exceto às 12 horas após o TCE.

O modelo de queda de peso padronizado nesse trabalho apresenta como limitações, principalmente, o fato de que existem poucos parâmetros que podem ser ajustados e que ele necessita de um aparato que possua as dimensões determinadas. O uso de diferentes modelos de TCE, linhagens de animais, protocolos e instrumentos de análise de comportamento e diferentes tempos de avaliação pode ser responsável por resultados contraditórios entre os diversos estudos. O presente estudo tem como vantagem a avaliação em diversos intervalos de tempo, em fase aguda e subaguda do TCE, considerando que a maioria dos estudos avaliou os animais em somente um ou dois momentos. Além disso, grande parte dos estudos não classificou ou não relatou a

gravidade do TCE (leve, moderada ou grave), o que dificultou, de certa forma, a discussão dos dados.

9. CONCLUSÕES

Alterações de comportamento estão associadas a alterações na concentração de citocinas no córtex e no hipocampo. O modelo de TCE por queda de peso, que foi padronizado neste estudo, mostrou alterações histopatológicas e comportamentais que são compatíveis com o que se observe em pacientes vítimas de TCE. Dessa forma, nosso modelo poderá ser útil para a ampliação dos conhecimentos relacionados a fisiopatologia da doença.

REFERÊNCIAS

Albert-Weissenberger, C.; Sirén, Anna-Leena. Experimental traumatic brain injury. *Experimental & Translational Stroke Medicine*. 2010 2:16.

Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp*. 2011 Aug 22;(54).

Alemam AI, Mohamad HA, Alhadad AA. Memory and attention impairment after traumatic brain injury. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2013;50(2):143-8.

Almeida CE, de Sousa Filho JL, Dourado JC, Gontijo PA, Dellaretti MA, Costa BS. Traumatic Brain Injury Epidemiology in Brazil. *World Neurosurg*. 2016; 87:540-547.

Andrade, A.F.; Paiva, W.S.; Amorim, R.L.O.; Figueiredo, E.G.; Neto, E.R.; Teixeira, M.J. 2009. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. *Rev Assoc Med Bras* 55, 75-81.

Badke M.R. Hematoma subdural agudo tramático: Um estudo de caso. *Revista Contexto e Saúde*. 2011; 10:999-1004.

Bahi A, Dreyer JL. Hippocampus-specific deletion of tissue plasminogen activator "tPA" in adult mice impairs depression- and anxiety-like behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012 Sep;22(9):672-82.

Baratz R, Rubovitch V, Frenk H, Pick CG. The influence of alcohol on behavioral recovery after mTBI in mice. *J Neurotrauma*. 2010 Mar;27(3):555-63.

Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS, Wisniewski SR, Whalen MJ, DeKosky ST. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma*. 1997 Jul;14(7):451-7.

Benady, A.; Freidin, D.; Pick, C. G.; Rubovitch, V. 2018. GM1 gangioside prevents axonal regeneration inhibition and cognitive deficits in a mouse model of traumatic brain injury. *Scientific Reports* 8: 13340, 1-10.

Bloom, B. M., Kinsella, K., Pott, J., Patel, H. C., Harris, T., Lecky, F., & Pearse, R. (2017). Short-term neurocognitive and symptomatic outcomes following mild traumatic brain injury: A prospective multi-centre observational cohort study. *Brain Injury*, 31(3), 304–311.

Bramlett, H.M., Dietrich, W.D., 2007. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Prog Brain Res* 161, 125-141.

Braun M, Khan ZT, Khan MB, Kumar M, Ward A, Achyut BR, Arbab AS, Hess DC, Hoda MN, Baban B, Dhandapani KM, Vaibhav K. Selective activation of cannabinoid receptor-2 reduces neuroinflammation after traumatic brain injury via alternative macrophage polarization. *Brain Behav Immun*. 2018 Feb;68:224-237.

Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, Peeters W, Feigin V, Theadom A, Holkovic L, Synnot A. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma*. 2016 Aug 25.

Bhowmick S, D'Mello V, Ponery N, Abdul-Muneer PM. Neurodegeneration and Sensorimotor Deficits in the Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Brain Sci*. 2018 Jan 6;8(1).

Bose, P., Hou, J., Nelson, R., Nissim, N., Parmer, R., Keener, J., ... Thompson, F. J. (2013). Effects of Acute Intrathecal Baclofen in an Animal Model of TBI-Induced Spasticity, Cognitive, and Balance Disabilities. *Journal of Neurotrauma*, 30(13), 1177–1191.

Budinich CS, Tucker LB, Lowe D, Rosenberger JG, McCabe JT. Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Jul;108:66-73.

Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*. 1999 Apr 15;19(8):3248-57.

Cernak, I. 2005. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2, 410-422.

Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, Greig NH, Wang JY. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2016 Oct 15;272:38-49.

Chhor, V.; Moretti, R.; Le Charpentier, T.; Sigaut, S; Lebon, S.; Schwendimann, L.; Oré, M.V.; Zuiani, C.; Milan, V.; Jossierand, J.; Vontell, R.; Pansiot, J.; Degos, V.;

Ikonomidou, C.; Titomanlio, L.; Haqberg, H.; Gressens, P.; Fleiss, B. 2017. Role of Microglia in a mouse model of paediatric traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 63, 197-209.

Costa, T., Constantino, L. C., Mendonça, B. P., Pereira, J. G., Herculano, B., Tasca, C. I., & Boeck, C. R. (2009). N-methyl-D-aspartate preconditioning improves short-term motor deficits outcome after mild traumatic brain injury in mice. *Journal of Neuroscience Research*,

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA – A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 1997;10:742-780.

Deb S, Lyons I, Koutzoukis C, Ali I, McCarthy G. Rate of psychiatric illness 1 year after traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*. 1999 Mar;156(3):374-8.

Deb S, Lyons I, Koutzoukis C. Neuropsychiatric sequelae one year after a minor head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:899-902.

Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Panchak M, Agrawal A, Adeleye A.O, Shrimel MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2018 Apr 1:1-18.

Fann JR, Katon WJ, Uomoto JM, Esselman PC. Psychiatric disorders and functional disability in outpatients with traumatic brain injuries. *Am J Psychiatry*. 1995 Oct;152(10):1493-9.

Faul, M.; Xu, L.; Wald, M.M.; Coronado, V.G. 2010. Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations and deaths 2002– 2006. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control [online], http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/tbi_ed.html.

Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, Starkey NJ, McPherson K, Kahan M, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *Lancet Neurol*. 2013;12(1):53–64.

Fernandes RNR, Silva M. Epidemiology of traumatic brain injury in Brazil. *Arq Bras Neurocir*. 2013;32(3):136-142.

Flierl, M.A.; Stahel, P.; Beauchamp, K.; Morgan, S.J.; Smith, W.R.; Shohami, E. 2009. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc* 4, 1328-1337.

Gaudêncio, T.G.; Leão, G.M. 2013. A epidemiologia do Traumatismo Crânio-encefálico: Um levantamento bibliográfico no Brasil. *Rev Neurocienc* 21, 427-434.

Gardner RC, Langa KM, Yaffe K. Subjective and objective cognitive function among older adults with a history of traumatic brain injury: A population-based cohort study. *PLoS Med.* 2017;14(3):e1002246.

Gentile, J.K.A.; Himuro, H.S.; Rojas, S.S.O.; Veiga, V.C.; Amaya, L.E.C.; Carvalho, J.C. 2011. Condutas no paciente com trauma cranioencefálico. *Rev Bras Clin Med* 9, 74-82.

Himanen L, Portin R, Isoniemi H, Helenius H, Kurki T, Tenovuo O. Longitudinal cognitive changes in traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Neurology.* 2006 Jan 24;66(2):187-92.

Holsinger T, Steffens DC, Phillips C, Helms MJ, Havlik RJ, Breitner JC, Guralnik JM, Plassman BL. Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2002 Jan;59(1):17-22.

Jorge RE, Robinson RG, Starkstein SE, Arndt SV. Depression and anxiety following traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1993 Fall;5(4):369-74.

Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Alonso OF, Aldana P, Dietrich WD (2001) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1189–1198

Kimble DE, Shields J, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM. Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS One.* 2012;7(7).

Knoblach, S. M., & Faden, A. I. (1998). Interleukin-10 Improves Outcome and Alters Proinflammatory Cytokine Expression after Experimental Traumatic Brain Injury. *Experimental Neurology*, 153(1), 143–151.

Koponen S, Taiminen T, Portin R, Himanen L, Isoniemi H, Heinonen H, Hinkka S, Tenovuo O. Axis I and II psychiatric disorders after traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Am J Psychiatry.* 2002 Aug;159(8):1315-21.

Koob AO, Colby JM, Borgens RB. Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol. *J Biol Eng.* 2008 Jun 27;2:9.

Kumar RG, Rubin JE, Berger RP, Kochanek PM, Wagner AK. Principal components derived from CSF inflammatory profiles predict outcome in survivors after severe traumatic brain injury. *Brain Behav Immun*. 2016 Mar;53:183-193.

Langlois, J.A.; Rutland-Brown, W.; Wald, M.M. 2006. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 21, 375-378.

Lazaroni, T.A.; Raslan, A.C.S.; Fontes, W.S.P.; Oliveira, M.L.; Bader, M.; Alenina, N.; Moraes, M.F.D.; Santos, R.A.; Pereira, G.S. 2012. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 97, 113-123.

Li W, Risacher SL, McAllister TW, Saykin AJ. Traumatic brain injury and age at onset of cognitive impairment in older adults. *J Neurol*. 2016 Jul;263(7):1280-5.

Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Sep;22(9):1011-7.

Maas, A.I.; Stocchetti, N.; Bullock, R. 2008. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7, 728-741.

Magalhães, A.L.G.; Souza, L.C.; Faleiro, R.M.; Teixeira, A.L.; Miranda, A.S. 2017. Epidemiologia do Traumatismo Cranioencefálico no Brasil. *Rev Bras Neurol* 53, 15-20.

Marmarou, A.; Foda, M.A.; van den Brink, W.; Campbell, J.; Kita, H.; Demetriadou, K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80, 291-300.

McAllister, T.W. 2011. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci* 12, 287-300.

McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*. 1989;28(1):233-44.

Mckee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015;127:45-66.

Mei Z, Zheng P, Tan X, Wang Y, Situ B. Huperzine A alleviates neuroinflammation, oxidative stress and improves cognitive function after repetitive traumatic brain injury. *Metab Brain Dis*. 2017 Dec;32(6):1861-1869.

Milman A, Rosenberg A, Weizman R, Pick CG. Mild traumatic brain injury induces persistent cognitive deficits and behavioral disturbances in mice. *J Neurotrauma*. 2005 Sep;22(9):1003-10.

Miotto EC, Cinalli FZ, Serrao VT, Benute GG, Lucia MC, Scaff M. Cognitive deficits in patients with mild to moderate traumatic brain injury. *Arq Neuropsiquiatr*. 2010;68(6):862-8.

Niechwiej-Szwedo E, Inness EL, Howe JA, Jaglal S, McIlroy WE, Verrier MC. Changes in gait variability during different challenges to mobility in patients with traumatic brain injury. *Gait Posture* 2007;25 (1):70–77.

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 Oct;20(10):985-93.

Oliveira, C.M.B.; Sakata, R.K.; Issy, A.M.; Gerola, L.R.; Salomão, R. Citocinas e Dor. 2011. *Rev Bras Anesthesiol* 61, 255-265.

Oliveira, D.M.P.; Pereira, C.U.; Freitas, Z.M.P. 2014. Escalas para avaliação do nível de consciência em trauma cranioencefálico e sua relevância para a prática de enfermagem em neurocirurgia. *Arq Bras Neurocir* 33, 22-32.

Onyszchuk, G.; Al-Hafez, B.; He, Y.Y.; Bilgen, M.; Berman, N.E.; Brooks, W.M. 2007. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *J. Neurosci. Methods* 160, 187–196.

Osborn AJ, Mathias JL, Fairweather-Schmidt AK, Anstey KJ. Anxiety and comorbid depression following traumatic brain injury in a community-based sample of young, middle-aged and older adults. *J Affect Disord*. 2017 Apr 15;213:214-221.

Pandey DK, Yadav SK, Mahesh R, Rajkumar R. Depression-like and anxiety-like behavioural aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rats: a model of comorbid depression and anxiety? *Behav Brain Res*. 2009 Dec 28;205(2):436-42.

Prince C, Bruhns ME. Evaluation and Treatment of Mild Traumatic Brain Injury The Role of Neuropsychology. *Brain Sci*. 2017 Aug 17;7(8).

Podhorna, J.; Brown, R.E. 2002. Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes Brain Behav* 1, 96-110.

Porter S, Torres IJ, Panenka W, Rajwani Z, Fawcett D, Hyder A, et al. Changes in brain-behavior relationships following a 3-month pilot cognitive intervention program for adults with traumatic brain injury. *Heliyon*. 2017;3(8):e00373.

Qu C, Lu D, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M. Effect of atorvastatin on spatial memory, neuronal survival, and vascular density in female rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2005 Oct;103(4):695-701.

Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R. 2002. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem* 383, 401-409.

Rickels, E., von Wild, K., & Wenzlaff, P. (2010). Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Injury*, 24(12), 1491–1504.

Santos WC, Vancini-Campanharo CR, Lopes MC, Okuno MF, Batista RE. 2016. Assessment of nurse's knowledge about Glasgow coma scale at a university hospital. *Einstein* 14 (2):213-218.

Schumann J, Alexandrovich GA, Biegon A, Yaka R. Inhibition of NR2B phosphorylation restores alterations in NMDA receptor expression and improves functional recovery following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2008 Aug;25(8):945-57.

Schwarzbold, M.L.; Rial, D.; Bem, T.; Machado, D.G.; Cunha, M.P.; Santos, A.A.; Santos, D.B.; Figueiredo, C.P.; Farina, M.; Goldfeder, E.M.; Rodrigues, A.L.S.; Prediger, R.D.S; Walz, R. 2010. Effects of Traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *Journal of Neurotrauma* 27, 1883-1893.

Settervall, C.H.; Sousa, R.M.; Furbringer e Silva, S.C. 2011. In-hospital mortality and the Glasgow Coma Scale in the first 72 hours after traumatic brain injury. *Rev Lat Am Enfermagem* 19, 1337-1343.

Silva Ddos S, Brito JN, Ibiapina JO, Lima MF, Medeiros AR, Queiroz BH, Paiva AL, Guedes VO. Closed head injury in rats: histopathological aspects in an experimental weight drop model. *Acta Cir Bras*. 2012 Apr;27(4):290-4.

Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, McIntosh TK. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*. 1995 Apr;12(2):169-78.

Stein DM, Lindel AL, Murdock KR, Kufera JA, Menaker J, Scalea TM. Use of serum biomarkers to predict secondary insults following severe traumatic brain injury. *Shock*. 2012 Jun;37(6):563-8.

Taylor, C.A.; Jeneita, M.B.; Matthew, J.B.; Likang, X. 2017. Traumatic Brain Injury–Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths — United States, 2007 and 2013. *Surveillance Summaries* 66, 1-16.

Taylor AN, Rahman SU, Tio DL, Sanders MJ, Bando JK, Truong AH, Prolo P. Lasting neuroendocrine-immune effects of traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006 Dec;23(12):1802-13.

Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma*. 2005 Jan;22(1):42-75. Review.

Tucker LB, Burke JF, Fu AH, McCabe JT. Neuropsychiatric Symptom Modeling in Male and Female C57BL/6J Mice after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017 Feb 15;34(4):890-905.

Tweedie D, Milman A, Holloway HW, Li Y, Harvey BK, Shen H, Pistell PJ, Lahiri DK, Hoffer BJ, Wang Y, Pick CG, Greig NH. Apoptotic and behavioral sequelae of mild brain trauma in mice. *J Neurosci Res*. 2007 Mar;85(4):805-15.

Vieira C, De Lima TC, Carobrez Ade P, Lino-de-Oliveira C. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. *Neurosci Lett*. 2008 Nov 14;445(2):170-3.

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Feb;14(2):128-42.

Wallach, D., Kang, T.-B., & Kovalenko, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology*. 2013 14(1), 51–59.

Wakade C, Sukumari-Ramesh S, Laird MD, Dhandapani KM, Vender JR. Delayed reduction in hippocampal postsynaptic density protein-95 expression temporally correlates with cognitive dysfunction following controlled cortical impact in mice. *J Neurosurg*. 2010 Dec;113(6):1195-201.

Washington PM, Forcelli PA, Wilkins T, Zapple DN, Parsadonian M, Burns MP. The

effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate, and severe controlled cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma*. 2012 Sep;29(13):2283-96.

Werner, C.; Engelhard, K. 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 99, 4-9.

Winter CD, Iannotti F, Pringle AK, Trikkas C, Clough GF, Church MK. A microdialysis method for the recovery of IL-1beta, IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo. *J Neurosci Methods*. 2002 Sep 15;119(1):45-50.

Wiseman TA, Curtis K, Lam M, Foster K. Incidence of depression, anxiety and stress following traumatic injury: a longitudinal study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2015 Mar 28;23:29.

Wojnarowicz MW, Fisher AM, Minaeva O, Goldstein LE. Considerations for Experimental Animal Models of Concussion, Traumatic Brain Injury, and Chronic Traumatic Encephalopathy-These Matters Matter. *Front Neurol*. 2017 Jun 1;8:240.

Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013 Mar 4;4:18.

Yates PJ, Williams WH, Harris A, Round A, Jenkins R. An epidemiological study of head injuries in a UK population attending an emergency department. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77: 699–701.