UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CREATINA AUMENTA A ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase E PREVINE O APARECIMENTO DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leonardo Magno Rambo

Santa Maria, RS, Brasil, 2010

CREATINA AUMENTA A ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase E PREVINE O APARECIMENTO DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS

por

Leonardo Magno Rambo

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

CREATINA AUMENTA A ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase E PREVINE O APARECIMENTO DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS

elaborada por
Leonardo Magno Rambo

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____
Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

_____
Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)
(1º membro da banca)

_____
Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)
(2° membro da banca)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Aos meus pais, Rogério e Scheila, simplesmente essenciais e fundamentais, por sempre acreditarem, apoiarem e incentivarem, em qualquer situação. Às minhas irmãs Chris e Carol, meu afilhado Arthur e minha avó Esthér, pela base familiar, essencial para a formação do meu caráter.

Ao meu orientador e amigo, Luiz Fernando, por todos os momentos de aprendizado e pela oportunidade de fazer parte do NOSSO grupo.

Ao meu co-orientador, grande amigo, Mauro, pelas discussões, sugestões e transmissão de conhecimento sem igual, indispensável em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório (banda Estereotáxicos), Samurai, Xará, Maurício e Fred, basicamente, por tudo.

À família LABNEURO, por toda a convivência, cumplicidade, discussões científicas (ou não), idéias, festas, bebedeiras, churrascos e afins.

Aos meus amigos, da vida, pelos momentos *OFF* trabalho. Mariana, Brisa, Gi e Lu, muito obrigado!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de subir mais um degrau na vida acadêmica.

E, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

"Dar o exemplo não é a melhor maneira
de influenciar os outros. É a única."

- Albert Schweitzer -

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

CREATINA AUMENTA A ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase E PREVINE O APARECIMENTO DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS

Autor: Leonardo Magno Rambo
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

A creatina, um composto guanidínico endógeno, sintetizado pelos rins, fígado, pâncreas, testículos e cérebro, tem sido alvo de diversos estudos ao longo dos últimos anos. Apesar da grande maioria dos estudos atribuírem os efeitos da creatina ao seu papel de tamponamento de energia, recentes achados têm proposto ações não relacionadas ao metabolismo energético. Estudos têm demonstrado que este composto pode agir como neuromodulador no Sistema Nervoso Central (SNC). Dentre estas ações neuromodulatórias, demonstrou-se que a creatina pode modular os receptores do subtipo N-metil-$_D$-aspartato (NMDA) em fatias de hipocampo de ratos. É bem descrito na literatura que a estimulação destes receptores ativa a enzima Na^+,K^+-ATPase. Além disso, pouco se sabe sobre o papel agudo deste composto no SNC. Desta forma, o objetivo do capítulo I deste estudo foi verificar o efeito da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, bem como sua provável via de sinalização intracelular. Os resultados demonstraram que a incubação de fatias de hipocampo de ratos, com creatina, aumentou a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase $\alpha_{2/3}$ *in vitro* e, que a injeção intracerebroventrical (i.c.v) deste composto, aumentou a atividade da enzima *ex vivo*. Verificou-se também que o tratamento das fatias hipocampais com fosfocreatina e creatinina não alterou a atividade enzimática, sugerindo que o mecanismo de ação da creatina é independente do metabolismo energético. Além disso, foi evidenciada a participação dos receptores NMDA-NR2B, bem como a ativação da enzima calcineurina. Nós constatamos também o envolvimento das enzimas proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e da proteína quinase C (PKC) no efeito da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase. No segundo capítulo deste estudo, decidimos verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), uma vez que este agente quimioconvulsivante inibe a enzima Na^+,K^+-ATPase sem alterar o *status* bioenergético celular. Constatamos que a creatina protegeu contra as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ. Além disso, o tratamento agudo com creatina preveniu a inibição da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase induzida por PTZ. Com base nestas evidências, sugerimos que este composto guanidínico pode estar atuando através de um mecanismo alternativo, não dependente do metabolismo energético, através da modulação da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase.

Palavras-chave: creatina, Na^+,K^+-ATPase, PTZ, NMDA

ABSTRACT

Dissertation of Master Degree
Post-Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

CREATINE INCREASES Na^+,K^+-ATPase ACTIVITY AND PREVENTS SEIZURES INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE IN RATS

Author: Leonardo Magno Rambo
Advisor: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Co-advisor: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira
Date and Place: Santa Maria, February, 26th, 2010.

Creatine, an endogenous guanidino compound produced on liver, kidneys, pancreas, testes and brain, has been aim of several studies over the last years. Although most studies attribute the effects of creatine to their energetic buffer role, recent findings have suggested actions non-related to energy metabolism. Researches have shown that this compound may act as a neuromodulator in the central nervous system (CNS). Among these neuromodulatory actions, was demonstrated that creatine modulates NMDA receptors in rat hippocampal slices. It is well know that stimulation of these receptors activates Na^+,K^+-ATPase. Moreover, little is known about the acute role of this compound on CNS. Thus, the objective of the chapter I of this paper was to investigate the effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity and the intracellular signaling pathway involved. The results showed that creatine treatment of rat hippocampal slices increased Na^+,K^+-ATPase $\alpha_{2/3}$ activity *in vitro*. The intracerebroventricular administration of this compound also increased the enzyme activity, *ex vivo*. Furthermore, creatinine and phosphocreatine treatment of hippocampal slices did not alter the enzyme activity, suggesting that the creatine mechanism of action is independent of energy metabolism. Additionally, we showed the involvement of NMDA-NR2B and calcineurin. We found also the involvement of the PKA and PKC in the effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity. In the second chapter of this study, we decide to verify the effect of acute creatine administration on PTZ-induced seizures, since this convulsant agent inhibits Na^+,K^+-ATPase activity without alter bioenergetic cellular state. We found that creatine treatment protected against behavioral and electroencephalographic seizures induced by PTZ. Moreover, creatine acute treatment prevented PTZ-induced inhibition of Na^+,K^+-ATPase activity. Based on present findings, we suggest that creatine may act through an alternative mechanism, independent of energetic metabolism, by modulation of Na^+,K^+-ATPase activity.

Key-words: Creatine, Na^+,K^+-ATPase, PTZ, NMDA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-Br-AMPc - 8-Bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico

aCSF - Fluído cérebro-espinhal artificial (líquido cefalorraquidiano artificial)

AdoHcy - S-adenosil-L-homocisteína

AdoMet - S-adenosil-L-metionina

ADP - Difosfato de adenosina

AGAT - L-arginina: glicina amidinotransferase

AP-5 - 2-amino-5-fosfopentanoato

ATP - Trifosfato de adenosina

CMC - Carboximetilcelulose

Cr - Creatina

Crn - Creatinina

CrT - Transportador de creatina

CK - Creatina quinase

GA - Ácido glutárico

GAA - Guanidino acetato

GABA - Ácido gama-aminobutírico

$GABA_A$ - Receptor ionotrópico de GABA

GAMT - S-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase

i.p. - Intraperitoneal

i.c.v. - Intracerebroventricular

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil éster

MK-801 - (5R,10S) - (+) 5 - Metil - 10,11 - dihidro - 5 H – dibenzo [a,d] ciclohepten - 5,10 - imino hidrogênio maleato

MMA - Ácido metilmalônico

NMDA - N-metil-$_D$-aspartato

NOS - Óxido nítrico sintase

PKA - Proteína quinase dependente de AMPc

PKC - Proteína quinase C

PMA - Forbol 12-miristato 13-acetato

PTZ - Pentilenotetrazol

p.o. - *per oralis*

PP2B - Proteína fosfatase dependente de Ca^{2+}/Calmodulina - Calcineurina

SNC - Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo da creatina	24
Figura 2	Estrutura da enzima Na^+,K^+-ATPase	32
Figura 3	Resultados - PTZ 30 mg/kg, i.p.	74
Figura 4	Resultados - PTZ 45 mg/kg, i.p.	76
Figura 5	Resultados - PTZ 60 mg/kg, i.p.	78
Figura 6	Resultados - atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase	80
Figura 7	Conclusão do capítulo I	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

2. OBJETIVOS 19

2.1. OBJETIVO GERAL 20

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

2.2.1. Capitulo I 20

2.2.2. Capitulo II 21

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22

3.1. CREATINA 23

3.1.1. História 23

3.1.2. Síntese 25

3.1.3. Transporte e metabolismo 25

3.1.4. Erros inatos do metabolismo da creatina 26

3.1.5. Papel em doenças neurológicas 27

3.1.6. Ações independentes do metabolismo energético 28

3.2. Na^+,K^+-ATPASE 29

3.2.1. Aspectos gerais 29

3.2.2. Estrutura 30

3.2.3. Regulação 32

3.2.4. Aspectos patológicos da Na^+,K^+-ATPase no cérebro 34

3.3. EPILEPSIA E CONVULSÕES 35

3.3.1. Aspectos gerais 35

3.3.2. Epidemiologia 37

3.3.3. Modelos experimentais 38

CAPÍTULO I

4. ARTIGO CIENTÍFICO 41

4.1. AUMENTO NA ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPASE HIPOCAMPAL PELA CREATINA: AÇÃO MEDIADA POR FUNÇÃO GLUTAMATÉRGICA 42

CAPÍTULO II

5. MATERIAIS E MÉTODOS.....66

5.1. ANIMAIS E REAGENTES.....67

5.2. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....67

5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Na^+,K^+-ATPASE.....68

5.4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA.....68

5.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....69

5.6. EXAME E ANÁLISE ELETROENCEFALOGRÁFICA.....69

5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....70

6. RESULTADOS.....71

6.1. LEGENDA DAS FIGURAS.....74

6.1.1. Figura 3.....75

6.1.2. Figura 4.....77

6.1.3. Figura 5.....79

6.1.4. Figura 6.....80

7. DISCUSSÃO.....81

8. CONCLUSÕES.....89

8.1. CAPÍTULO I.....90

8.2. CAPÍTULO II.....91

9. BIBLIOGRAFIA.....92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A creatina é um composto guanidínico sintetizado endogenamente nos rins, fígado, pâncreas, testículos e cérebro, a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina, através da ação das enzimas $_L$-arginina:glicina amidino transferase (AGAT) e S-adenosil-$_L$-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase (GAMT) (BRAISSANT et al., 2001; PERSKY & BRAZEAU, 2001). Além disso, este composto guanidínico pode ser obtido através da dieta, principalmente pelo consumo de carne vermelha e peixe (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000). Após seu consumo ou síntese endógena, a creatina é transportada para os tecidos, através de transporte ativo dependente de Na^+ e Cl^- (MAK et al., 2009). Uma vez nos tecidos, a creatina pode ser convertida a fosfocreatina, reação catalisada pela enzima creatina quinase, ou sofrer metabolismo espontâneo não enzimático, formando creatinina (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

Devido a sua importância fisiológica como mecanismo de reserva e tampão energético (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000; PAN & TAKAHASHI, 2007), a creatina tem sido utilizada por atletas como suplemento ergogênico, para melhorar o desempenho em exercícios de alta intensidade e curta duração. Devido a estas propriedades, a creatina se tornou um dos suplementos nutricionais mais populares no mundo (PERSKY & BRAZEAU, 2001). Cabe salientar, contudo, que os benefícios da suplementação com creatina vão além dos obtidos pelos atletas, na medida em que apresenta propriedades antioxidantes diretas (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006), bem como neuroprotetoras, em uma variedade de doenças neurológicas, tais como, hipóxia, esclerose lateral amiotrófica, acidente vascular encefálico, doença de Parkinson e acidemias orgânicas (HOLTZMAN et al., 1998a; WICK et al., 1999; MALCON et al., 2000; ROYES et al., 2003; 2006; KLIVENYI et al., 2004). Além de seu efeito neuroprotetor, alguns estudos têm sugerido que a creatina pode ser sintetizada nos astrócitos, captada pelos neurônios (BRAISSANT et al., 2001) e liberada por exocitose, dependente de despolarização (ALMEIDA et al., 2006). Estes dados sugerem que a creatina

não é somente sintetizada e captada por neurônios, mas também liberada de uma maneira dependente de potencial de ação, sugerindo fortes evidências para seu papel como neuromodulador no cérebro (ALMEIDA et al., 2006).

Recentemente, dados experimentais do nosso grupo têm sugerido que a combinação entre a suplementação com creatina e exercício físico pode ser uma estratégia útil no tratamento de distúrbios convulsivos, na medida em que protegem das convulsões, bem como do dano oxidativo a alvos específicos da célula, como a Na^+,K^+-ATPase, após a administração de PTZ (RAMBO et al., 2009). Por outro lado, embora seja aceito, de modo geral, que a suplementação com creatina possa exercer efeitos neuroprotetores em diversas doenças neurológicas, como a epilepsia (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000), se torna importante o entendimento dos processos neuroquímicos envolvidos nesta proteção, visto que a suplementação crônica com creatina tem efeitos deletérios em um modelo de epilepsia do lobo temporal, induzida por pilocarpina (VIELHABER et al., 2003) e nenhum efeito nas convulsões recorrentes espontâneas induzidas por ácido caínico (MIKATI et al., 2004).

A epilepsia é uma síndrome caracterizada por crises espontâneas e recorrentes e é o resultado de descargas paroxísticas, excessivas e sincrônicas de uma população neural (ENGEL, 1996). A epilepsia, contudo, não é uma doença específica, ou uma única síndrome, mas compreende uma ampla categoria de sintomas complexos, decorrentes de disfunções cerebrais, que podem ser secundárias a um grande número de processos patológicos (GUERREIRO et al., 2000). Estudos em modelos experimentais têm contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia desta síndrome, na medida em que reproduzem, pelo menos em parte, as manifestações que ocorrem em humanos (LOTHMAN et al., 1995). Neste sentido, experimentos realizados *in vitro*, com tecidos de animais, têm demonstrado a existência de atividade epileptiforme evocada e alterações dos mecanismos inibitórios e excitatórios. Neste contexto, o PTZ tem sido utilizado para induzir convulsões em camundongos, ratos, gatos e primatas, por despolarização neuronal através do bloqueio do canal de cloreto associado ao receptor $GABA_A$. Além disso, o PTZ é um convulsivante com alto valor preditivo para o desenvolvimento de novos agentes anticonvulsivantes e um dos modelos mais utilizados para o

estudo da excitabilidade cerebral em ratos, na medida em que a crise convulsiva induzida por este quimioconvulsivante reproduz diversos tipos de convulsões evidenciados em seres humanos, como a crise parcial complexa com generalização secundária e a crise do tipo ausência (KUPFERBERG, 2001).

Recentemente, um considerável número de estudos tem evidenciado que a depleção energética induzida por alguns ácidos orgânicos, como o metilmalonato (MMA) e o ácido glutárico (GA), desencadeia despolarização neuronal e convulsões, por redução na atividade de ATPases de membranas (McLAUGHLIN et al., 1998; SILVA et al., 2000; MALFATTI et al., 2003). De fato, a estabilização do potencial de repouso da membrana, pela Na^+,K^+-ATPase é essencial para a manutenção do bloqueio de magnésio dependente de voltagem do receptor NMDA, para a função de canais iônicos dependentes de voltagem e também aos transportadores de glutamato dependente de Na^+. Assim, a perda da atividade da Na^+,K^+-ATPase pode diminuir o limiar para uma hiperexcitabilidade neuronal (GEGELASHVILI & SCHOUSBOE, 1997). Neste contexto, tem sido evidenciado que mutações nos genes que codificam a subunidade α da Na^+,K^+-ATPase estão relacionadas com a epilepsia em humanos (JURKAT-ROTT et al., 2004) e que cérebros *post-mortem* de pacientes com epilepsia apresentam a atividade da Na^+,K^+-ATPase diminuída. (GRISAR et al., 1992). Além disso, estudos com modelos experimentais têm demonstrado que o inibidor da Na^+,K^+-ATPase, ouabaína, aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (FUJISAWA et al., 1965), causa convulsões em camundongos (JAMME et al., 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (LI & STYS, 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (LEES et al., 1990).

A enzima Na^+,K^+-ATPase é uma proteína integral da membrana plasmática que transporta Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula, utilizando a energia fornecida pela hidrólise do ATP. No cérebro, a atividade desta enzima é essencial para a manutenção do gradiente eletroquímico, modulação dos potenciais de repouso e liberação de neurotransmissores (STAHL & HARRIS, 1986). Desta forma, a Na^+,K^+-ATPase pode ser alvo de neurotransmissores, hormônios e outras substâncias que, agindo diretamente na enzima ou através de suas vias de sinalização intracelulares específicas, podem regular a

atividade da Na^+,K^+-ATPase, através da fosforilação de resíduos específicos nesta enzima, principalmente na subunidade α (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

Dentre um dos mecanismos regulatórios da Na^+,K^+-ATPase se destaca a calcineurina, uma fosfatase dependente de cálcio, também conhecida como PP2B, que estimula a atividade da Na^+,K^+-ATPase por desfosforilar o resíduo serina-23 na subunidade α. Neste sentido, sabe-se que a estimulação do receptor NMDA ativa a calcineurina em diferentes estruturas cerebrais, incluindo o hipocampo e fatias de estriado de ratos (HALPAIN et al., 1990, HALPAIN & GREENGARD, 1990). Além disso, tem sido evidenciado que o tratamento de fatias hipocampais, com creatina, aumenta as respostas eletrofisiológicas neste tecido e, este efeito, é revertido pelo co-tratamento com AP-5, um antagonista de receptores do subtipo NMDA (ROYES et al., 2008). A creatina também aumenta a ligação de [^{3}H]MK-801, indicando que este composto guanidínico pode estar facilitando a transmissão sináptica por ativar receptores NMDA (ROYES et al., 2008).

Na medida em que diversos estudos descrevem ações independentes do mecanismo energético para a creatina (PERSKY & BRAZEAU, 2001; LAWLER et al, 2002; SESTILI et al., 2006; ANDRES et al., 2008), é plausível propor que parte dos efeitos protetores exercidos pela creatina, no SNC, seja devido ao seu papel neuromodulador. Todavia, a compreensão deste fenômeno neuromodulador passa pelo conhecimento dos mecanismos biológicos específicos subjacentes da creatina no SNC. Cabe salientar ainda, que a epilepsia é compreendida como um fenômeno biológico multifacetado que, por conseqüência, causa um grau de dificuldade de manejo tanto para o reconhecimento, diagnóstico, tratamento e manutenção de sua terapêutica ao longo de sua evolução (BLUME, 1997; UDANI, 2000; FONG & FONG, 2001). Desta forma, uma vez que existem várias lacunas no entendimento do processo de desenvolvimento da epilepsia (SHNEKER & FOUNTAIN, 2003), bem como no papel neuroprotetor da creatina, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da enzima Na^+,K^+-ATPase no desenvolvimento das convulsões induzidas pela injeção de PTZ, bem como no possível efeito neuromodulador exercido pela creatina.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo consiste em investigar o efeito da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, bem como avaliar o papel desta enzima no desenvolvimento das atividades convulsivas induzidas pelo PTZ e no possível efeito neuroprotetor exercido pela creatina em ratos.

2.2. Objetivos específicos

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados, convém dividi-los:

2.2.1. Capitulo I

1. Verificar se a creatina altera a atividade hipocampal da enzima Na^+,K^+-ATPase *in vitro* e *ex-vivo*;

2. Avaliar a participação dos receptores NMDA e sua via de sinalização intracelular na ativação da enzima Na^+,K^+-ATPase hipocampal, induzida por creatina, *in vitro*, em;

3. Investigar o envolvimento da creatinina e da fosfocreatina na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase hipocampal, *in vitro*;

4. Verificar se o efeito da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase hipocampal é específico para alguma subunidade α desta enzima, *in vitro*.

2.2.2. Capitulo II

1. Verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por doses crescentes de PTZ.

2. Investigar o papel da enzima Na^+,K^+-ATPase nas alterações comportamentais e eletrográficas induzidas pelas doses crescentes de PTZ e no possível papel neuroprotetor da creatina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Creatina

3.1.1. História

Em 1835, o cientista francês Michel Eugene Chevreul descobriu, em um extrato de carne, uma nova substância orgânica até então não identificada, a qual batizou de creatina, derivada da palavra grega *kreas*, que significa carne (CHEVREUL, 1835).

Na Alemanha, em 1847, Justus von Liebig descreveu a creatina como um componente essencial para a manutenção da atividade muscular, após observar que a carne de raposas selvagens apresentava cerca de 10 vezes mais creatina que as mesmas espécimes criadas em cativeiro. Alguns anos mais tarde, em 1885, Max von Pettenkofer e Wilhelm Heinrich Heintz identificaram, na urina, uma substância do metabolismo da creatina, a qual foi nomeada, por Liebig, de creatinina (THOMAS, 1934).

Posteriormente, em 1927, Cyrus Fiske e Yellapragada Subbarow descobriram, em músculo relaxado de gato, outra substância relacionada à creatina, um composto fosforilado, o qual chamaram de fosfocreatina. Os mesmos autores relataram que, após o músculo ser estimulado eletricamente, as concentrações de fosfocreatina encontravam-se reduzidas, mas após um período, retornavam aos níveis iniciais. Estes estudos levaram os cientistas a concluir que a fosfocreatina estava envolvida com o gasto energético para a contração muscular (FISKE & SUBBAROW, 1927).

Em 1932, o cientista alemão Karl Lohmann foi o primeiro a detectar a atividade muscular da enzima creatina quinase. Esta enzima catalisa a reação reversível de transferência do fosfato γ do ATP para a creatina, formando fosfocreatina e ADP (Figura 1). Apenas em 1934 Lohmann confirmou

experimentalmente esta importante reação que, posteriormente, foi chamada de reação de Lohmann (WYSS & SCHULZE, 2002).

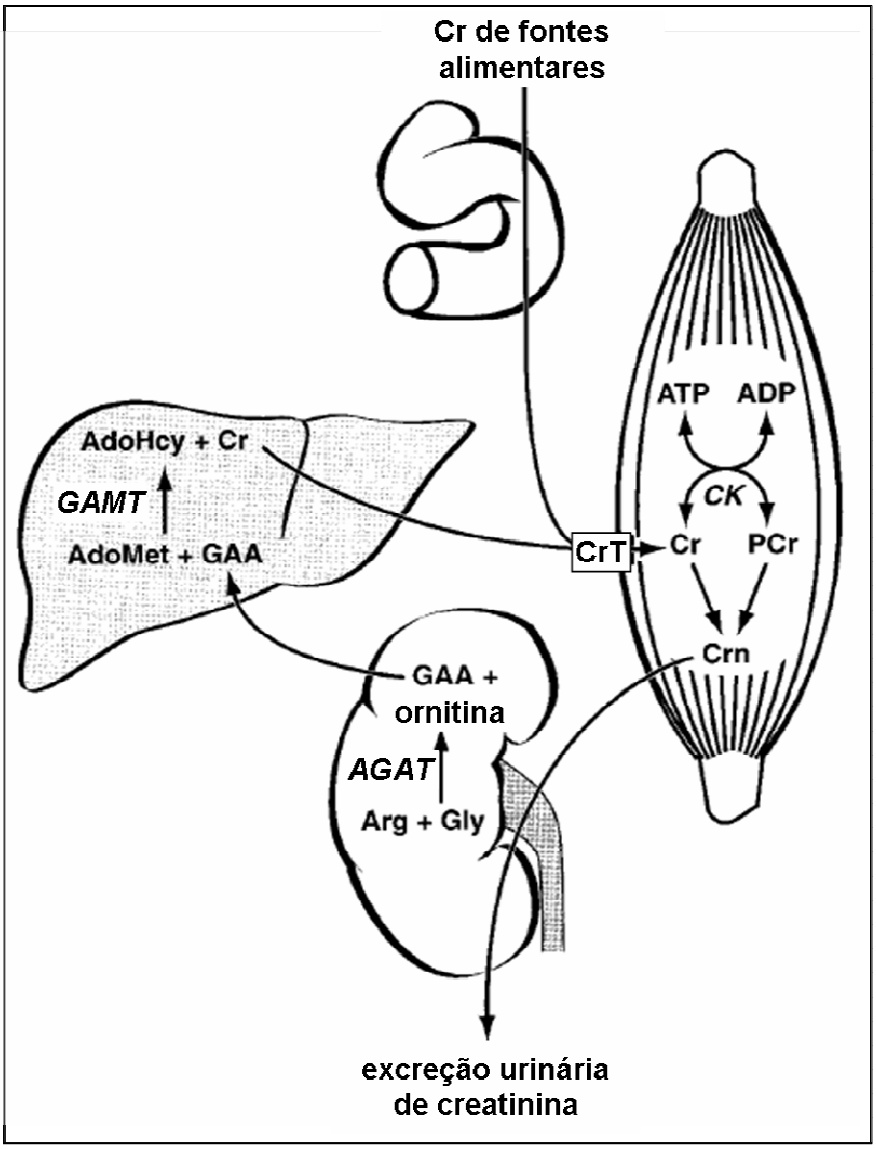


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da creatina dietética e endógena no corpo humano. Cr - creatina; PCr - fosfocreatina; CK - creatina quinase; GAMT - S-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase; AGAT - L-arginina:glicina amidino transferase; Crn - creatinina; GAA - guanidino acetato; Arg - arginina; Gly - glicina ; AdoMet - S-adenosil-L-metionina; AdoHcy - S-adenosil-L-homocisteína; CrT - transportador de creatina (adaptado de WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

3.1.2. Síntese

A creatina pode ser obtida tanto da dieta quanto sintetizada endogenamente, sendo que as principais fontes dietéticas são a carne vermelha e o peixe fresco (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000). Aproximadamente metade da necessidade diária dos humanos é obtida através da síntese endógena, por uma reação de 2 passos, envolvendo as enzimas $_L$-arginina:glicina amidino transferase (AGAT) e S-adenosil-$_L$-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase (GAMT) (Figura 1). Esta reação pode ocorrer nos rins, fígado, pâncreas, testículos e cérebro (PERSKY & BRAZEAU, 2001). No cérebro, as enzimas responsáveis pela biossíntese de creatina são expressas nos neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, indicando que a creatina utilizada pelas células neuronais é sintetizada *in situ*, uma vez que a densidade de transportadores específicos para a creatina na barreira hemato-encefálica é baixa (BRAISSANT et al., 2001).

3.1.3. Transporte e metabolismo

Uma vez obtida pela dieta ou sintetizada endogenamente, a creatina entra na circulação por difusão e pode ser transportada para o interior dos tecidos, contra um gradiente de concentração, por um transportador específico (CrT) dependente de Na^+ e Cl^-, cuja estequiometria é de 2 Na^+/Cl^-/creatina (MAK et al., 2009). Este transportador é o membro A8 da família de transportadores carreadores de soluto 6 (SLC6A8), que inclui transportadores de neurotransmissores como GABA, dopamina, norepinefrina e 5-HT (CHRISTIE, 2007). A captação de creatina pelos CrTs pode ser regulada por insulina, IGF-1, β- e α-agonistas e atividade física, através de modulação do estado de fosforilação e/ou glicosilação dos transportadores (PERSKY & BRAZEAU, 2001).

Após o transporte para o meio intracelular a creatina pode ser armazenada, sob as formas de creatina ou fosfocreatina. Tanto a creatina

quanto a fosfocreatina, juntamente com a enzima creatina quinase, constituem uma importante parte da rede energética de células com grande demanda energética, como as células musculares esqueléticas, cardíacas e neuronais. Nestes tecidos, a creatina é o substrato para a enzima creatina quinase que transfere o fosfato γ do ATP para a creatina, produzindo fosfocreatina, nos sítios de produção de energia (mitocôndria). Através de transportadores específicos na membrana mitocondrial, a fosfocreatina é transportada para os sítios de alta demanda e consumo de energia, onde restaura o ATP a partir do ADP, pelo consumo da fosfocreatina (SPEER et al., 2004). Além disso, a creatina pode ser eliminada pela filtração glomerular, na forma de creatinina, que é o produto final da degradação da creatina, formada por uma reação espontânea, não-enzimática e irreversível em meio aquoso (GREENHAFF, 1996).

3.1.4. Erros inatos do metabolismo da creatina

Uma deficiência cerebral de creatina pode estar envolvida na patogênese de diversas doenças neurológicas. Estas doenças relacionadas ao metabolismo da creatina fazem parte de um grupo de erros inatos chamados de síndrome de deficiência de creatina. Estas síndromes podem ser devido ao comprometimento da síntese endógena, ou seja, nas enzimas AGAT ou GAMT, ou ainda, um déficit nos mecanismos de transporte de creatina (ANDRES et al., 2008).

Estas síndromes são doenças relativamente novas, uma vez que o primeiro relato foi feito por Stöckler e colaboradores em 1994, que identificaram um comprometimento na enzima GAMT. Esta síndrome é uma doença recessiva autossômica e geralmente se manifesta nos primeiros meses de vida, apresentando atrasos, ou mesmo regressão no desenvolvimento. Os sintomas clínicos são heterogêneos e incluem retardo mental, movimentos extrapiramidais involuntários, problemas na fala, epilepsia, hipotonia muscular, fraqueza e, em pacientes idosos, autismo com comportamento autodestrutivo (WYSS & SCHULZE, 2002).

A deficiência na AGAT foi descrita pela primeira vez em 2001, identificada como uma doença autossômica recessiva. Os pacientes sofrem retardo mental e grave atraso na linguagem. Da mesma maneira, a primeira deficiência no transportador de creatina foi identificada em 2001. É caracterizada por ser uma doença progressiva ligada ao cromossomo X. Os pacientes com deficiência no transporte de creatina apresentam retardo mental e grave atraso na fala e linguagem expressiva. Além disso, manifestam grave hipotonia central, apesar de as funções motoras grossas e finas serem normais (WYSS & SCHULZE, 2002). Os últimos relatos científicos acerca da deficiência no transportador de creatina têm relatado o desenvolvimento de epilepsia por parte dos pacientes que sofrem desta síndrome (FONS et al., 2008; FONS et al., 2009; PUUSEPP et al., 2009; SEMPERE et al., 2009).

3.1.5. Papel em doenças neurológicas

Devido ao seu importante papel fisiológico como tampão energético, através do transporte de ATP dos sítios de produção (mitocôndria) para os sítios de consumo, em processos dependentes de ATP (citosol, citoesqueleto e organelas), a creatina tem sido amplamente utilizada por atletas na tentativa de melhorar o desempenho físico, graças a sua característica de rápido fornecimento de energia (WILLIAMS & BRANCH, 1998). Neste sentido, a creatina vem sendo alvo de diversos estudos, nos quais são testadas as possíveis ações frente a estudos clínicos e modelos experimentais de doenças neurológicas (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000; SAKELLARIS et al., 2006; PRASS et al., 2007).

Apesar de diversas doenças neurológicas serem causadas por distintos fatores primários, elas tendem a convergir para uma conseqüência secundária semelhante, caracterizada por um déficit no metabolismo energético celular. Resumidamente, os níveis celulares de ATP encontram-se reduzidos, o que resulta em acúmulo citosólico de Ca^{2+} e formação de radicais livres. Tanto o Ca^{2+} quanto as espécies reativas podem ativar vias de morte celular necróticas

ou apoptóticas (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000; WYSS & SCHULZE, 2002).

Dentre os estudos clínicos e experimentais, a creatina já foi testada com resultados positivos em doenças como Alzheimer (BÜRKLEN et al., 2006), Parkinson (BENDER et al., 2006, 2008), Huntington (FERRANTE et al., 2000, RYU et al., 2005, HERSCH et al., 2006), esclerose lateral amiotrófica (ELLIS & ROSENFELD, 2004, SHEFNER et al., 2004, ROSENFELD et al., 2008), traumatismo crânio-encefálico (RABCHEVSKY et al., 2003, SCHEFF & DHILLON, 2004, SAKELLARIS et al., 2006), isquemia (ZHU et al., 2004, PRASS et al., 2007) e convulsões induzidas por PTZ (RAMBO et al., 2009), metilmalonato (ROYES et al., 2003, 2006) e ácido glutárico (MAGNI et al., 2007).

3.1.6. Ações independentes do metabolismo energético

Embora a maioria dos estudos conceda os benefícios da creatina ao seu conhecido papel fisiológico de tamponamento energético, recentes trabalhos têm descrito diversas ações não relacionadas ao metabolismo energético.

Neste ponto de vista, alguns trabalhos têm descrito uma ação antioxidante direta para a creatina (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006). Tem sido proposto também que a creatina pode estimular a síntese protéica por ser um agente osmolítico (PERSKY & BRAZEAU, 2001), uma vez que a hiperidratação celular poderia agir como um sinalizador anabólico e estimular a síntese protéica (HAUSSINGER et al., 1994). Além disso, Alfieri e colaboradores (2006) demonstraram que a creatina pode agir como um agente osmolítico compensatório, visto que protege células musculares expostas ao estresse hipertônico. Neste contexto, tem sido relatado que a creatina pode ser um dos principais osmólitos do cérebro (BOTHWELL et al., 2001; 2002). Prass e colaboradores (2007) demonstraram também que a creatina previne contra o declínio do fluxo sangüíneo cerebral após um evento isquêmico, independentemente de alterações no *status* bioenergético do tecido cerebral. Estudos têm relatado que a creatina pode ter ação antiapoptótica direta, por

reduzir a permeabilidade dos poros de transição mitocondrial, no cérebro (O'GORMAN et al., 1997; DOLDER et al., 2003).

No SNC, Braissant e colaboradores (2001) demonstraram que a creatina pode ser sintetizada nos astrócitos e captada pelos neurônios. Complementando esta ideia, em 2006, Almeida e colaboradores apresentaram evidências de que a creatina pode ser liberada de maneira exocitótica no SNC, dependente de potencial de ação, propondo uma possível ação neuromodulatória. De acordo com este ponto de vista, foi evidenciado que o tratamento de fatias hipocampais com creatina aumentou as respostas eletrofisiológicas neste tecido e, este efeito, foi revertido pelo co-tratamento com AP-5, um antagonista de receptores do subtipo NMDA (ROYES et al., 2008). Além disso, os mesmos autores verificaram que o tratamento com creatina aumentou a ligação de [^{3}H]MK-801, indicando que a creatina pode estar facilitando a transmissão sináptica por ativar receptores NMDA (ROYES et al., 2008), sendo esta mais uma forte evidência para seu possível papel como modulador no SNC.

3.2. Na^+,K^+-ATPase

3.2.1. Aspectos gerais

A enzima Na^+,K^+-ATPase (EC 3.6.3.9), também conhecida como bomba de sódio, é uma enzima integral de membrana, responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico celular através do transporte ativo de 3 Na^+ para o meio extracelular e 2 K^+ para o meio intracelular, com o gasto de 1 ATP (HORISBERGER, 2004). Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 1957, por Jens Christian Skou que, em seu estudo, demonstrou pela primeira vez a existência de uma enzima transportadora de íons através da membrana plasmática. Posteriormente, em 1997, Skou foi laureado com o prêmio Nobel de química, graças a sua descoberta (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

A Na^+,K^+-ATPase tem um importante papel na regulação do volume, pH e níveis de Ca^{2+} celulares, além do transporte de glicose dependente de Na^+ e regulação da liberação de neurotransmissores no SNC (LINGREL, 1992). Dada a importância desta enzima na regulação celular, sabe-se que, em repouso, a Na^+,K^+-ATPase é responsável pelo consumo de aproximadamente 30% de todo ATP utilizado pelos mamíferos (CLAUSEN et al., 1991).

3.2.2. Estrutura

A Na^+,K^+-ATPase pode ser encontrada em eucariotos superiores, como a *drosophila*, mas não nos eucariotos inferiores, como a levedura. É membro da família de bombas do tipo P, compartilhando algumas características comuns, como a função de hidrólise do ATP (LINGREL, 1992). Esta enzima é composta por 3 subunidades polipeptídicas (α, β e γ), sendo a unidade funcional mínima um heterodímero, composto por uma subunidade α e uma subunidade β, e este dímero pode ainda estar co-localizado com uma proteína da família FXYD (subunidade γ) (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). Pelo menos 4 isoformas distintas da subunidade α (α1-4) foram identificadas até o momento. Da subunidade β, pelo menos 3 isoformas (β1-3) foram identificadas, sendo que estas subunidades podem interagir e formar uma série de combinações que serão expressas de maneira dependente do tecido e espécie em estudo (MOBASHERI et al., 2000, THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

A subunidade α da Na^+,K^+-ATPase é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos, tem um peso molecular aproximado de 110 kDa e sua estrutura tridimensional tem 10 domínios transmembrana (Figura 2) (HORISBERGER, 2004). A subunidade α contém os sítios de ligação para Na^+ e K^+, ATP e também para o inibidor específico ouabaína (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). As diferenças na seqüência primária de aminoácidos entre as 4 subunidades α encontradas até o momento, em mamíferos, são mínimas, mas resultam em diferenças cruciais, principalmente no que diz respeito à sensibilidade a inibidores, como a ouabaína. De fato, enquanto as isoformas contendo subunidades α2 ou α3 possuem um IC_{50} para

ouabaína de 28,4 nM, as isoformas contendo subunidades α1 possuem um IC_{50} de 89,4 µM, para este mesmo inibidor (NISHI et al., 1999b). Além disso, é importante mencionar que as subunidades catalíticas α são substratos para a fosforilação, pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e pela proteína quinase C (PKC), ou desfosforilação, por uma série de proteínas fosfatases, como a proteína fosfatase 1, proteína fosfatase 2A e a PP2B, importantes para a regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da Na^+,K^+-ATPase (BERTORELLO et al., 1991; APERIA et al., 1992; FISONE et al., 1994; LOGVINENKO et al., 1996; BLANCO & MERCER, 1997; CHENG et al., 1997b).

A subunidade β da Na^+,K^+-ATPase é composta de aproximadamente 370 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 55 kDa (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). Esta proteína possui apenas um domínio transmembrana e a porção aminoterminal está exposta ao citosol (Figura 2). A função exata da subunidade β ainda não está completamente entendida, mas foi demonstrado que a subunidades α não exibe atividade ATPásica quando dissociada da subunidade β. Nesse contexto, tem sido sugerido que as principais funções da subunidade β da Na^+,K^+-ATPase estão relacionadas à estabilização da conformação ótima da subunidade α na membrana plasmática, além de uma participação direta no ciclo reacional acoplado ao transporte iônico (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003).

A subunidade γ da Na^+,K^+-ATPase é composta por aproximadamente 58 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 6,5 kDa (Figura 2) (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Esta proteína parece estar presente em quantidades equimolares se comparada às subunidades α e β. A função desta subunidade parece ser controversa na literatura, pois alguns estudos demonstram que a dissociação da subunidade γ do dímero αβ, com detergente não iônico, não altera a atividade da Na^+,K^+-ATPase, nem mesmo a afinidade por ouabaína ou a expressão funcional da enzima. Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a redução da subunidade γ pela utilização de antisense altera a afinidade por ouabaína, Na^+ e K^+. Entretanto, os estudos atuais ainda não são claros, de fato, sobre a função exata desta subunidade para a Na^+,K^+-ATPase (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

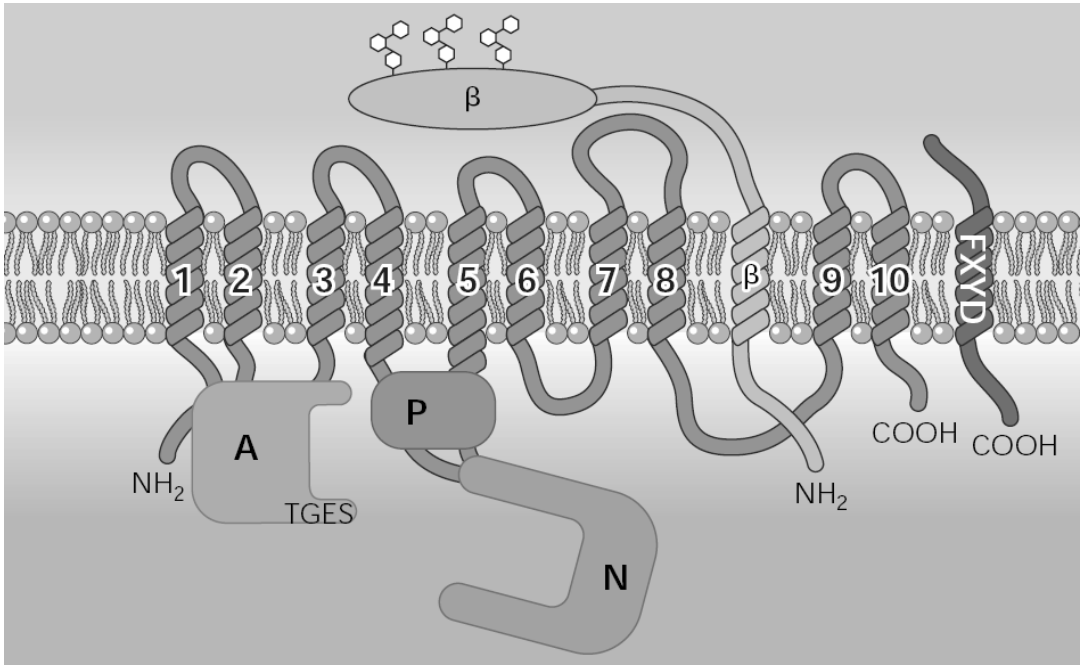


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da enzima Na^+,K^+-ATPase, com suas 3 subunidades (α, β e γ). A subunidade α apresenta 10 domínios transmembrana, com 3 importantes domínios: A - domínio atuador: controla a movimentação tridimensional da enzima, responsável pelas interações entre os aminoácidos que "abrem" ou "fecham" os canais para a entrada e saída dos cátions. N - domínio de ligação do nucleotídeo: local onde ocorre a ligação do ATP na subunidade α. P - domínio de fosforilação: sítio que recebe a fosforilação transitória do fosfato vindo da hidrólise do ATP. Subunidade β, uma glicoproteína. A proteína FXYD, também conhecida como subunidade γ (adaptado de HORISBERGER, 2004).

3.2.3. Regulação

A Na^+,K^+-ATPase é alvo de diversos mecanismos regulatórios, ativados por alterações nas necessidades celulares. Neste sentido, tem se demonstrado que a atividade da Na^+,K^+-ATPase é controlada por diversos hormônios, atividade contrátil, treinamento físico, nutrição e estado eletrolítico (CLAUSEN, 1998). Dentre estes fatores regulatórios, a variação na concentração dos substratos Na^+, K^+ e ATP é um dos mais simples e determinantes. A Na^+,K^+-ATPase é ativada por Na^+ e ATP em sítios intracelulares e por K^+ em um sítio

extracelular (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). O K_m da Na^+,K^+-ATPase para Na^+ está na faixa de 10-40 mM, que na maioria dos tecidos é um valor mais alto que a concentração intracelular de Na^+ no equilíbrio (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Assim, pequenas variações na concentração intracelular de Na^+ afetam profundamente a atividade da Na^+,K^+-ATPase na maioria dos tecidos. No caso do K^+, a concentração extracelular de K^+ tem menos efeito sobre a atividade da Na^+,K^+-ATPase do que variações na concentração intracelular de Na^+, provavelmente devido à alta afinidade deste íon por seus sítios de ligação na enzima e porque a concentração extracelular de íons K^+ é saturante para os sítios de ligação deste íon na Na^+,K^+-ATPase. Por outro lado, tem sido mostrado que o K^+ pode agir como um antagonista competitivo da ligação do Na^+ em seus sítios de ligação na Na^+,K^+-ATPase (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Assim, variações na concentração intracelular de K^+ poderiam alterar a atividade da enzima através de uma modificação na afinidade da mesma por íons Na^+. No que diz respeito ao ATP, a Na^+,K^+-ATPase apresenta uma cinética linear e um K_m de 300-800 μM para este substrato (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

Outro importante mecanismo de regulação da Na^+,K^+-ATPase é a fosforilação de resíduos específicos na enzima, principalmente na subunidade α. Neste sentido, neurotransmissores, hormônios e outras substâncias agem diretamente na enzima ou em seus receptores de membrana específicos, podendo ativar vias de sinalização que regulam a atividade da Na^+,K^+-ATPase. Dentre estas vias de sinalização, se destacam a via das quinases PKA e PKC e das fosfatases, principalmente a PP2B (calcineurina). Neste contexto, tem sido demonstrado que ativadores da PKA, tais como forskolina e Sp-5,6-DCl-cBIMPS, assim como o ativador da PKC forbol 12,13-dibutirato significantemente reduzem a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase em neurônios e células COS (linha celular derivada dos rins do macaco verde africano) (CHENG et al., 1997a, 1999, NISHI et al., 1999a). Outro estudo demonstrou que a ativação de receptores α-adrenérgicos induzem aumento na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase via Ca^{2+} e posterior ativação de calcineurina (APERIA et al., 1992). Além disso, estudos experimentais em cultura de neurônios cerebelares mostraram que a ativação de calcineurina, induzida por glutamato, desfosforila a Na^+,K^+-ATPase e leva a ativação desta

enzima (MARCAIDA, 1996). De fato, a literatura descreve o efeito estimulatório da ativação da calcineurina, via receptores NMDA, sobre a atividade da Na^+,K^+-ATPase em diversas estruturas cerebrais, incluindo hipocampo e fatias do estriado (HALPAIN et al., 1990, HALPAIN & GREENGARD, 1990).

3.2.4. Aspectos patológicos da Na^+,K^+-ATPase no cérebro

No cérebro, a atividade da Na^+,K^+-ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potencias de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores (STAHL & HARRIS, 1986). Consequentemente, mudanças na atividade da Na^+,K^+-ATPase afetam diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal, assim como o comportamento do animal (MOSELEY et al., 2007). Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da Na^+,K^+-ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR et al., 1992). De acordo, o inibidor da Na^+,K^+-ATPase, ouabaína, aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (FUJISAWA et al., 1965), causa convulsões em camundongos (JAMME et al., 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (LI & STYS, 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (LEES et al., 1990). Além disso, a supressão genética da Na^+,K^+-ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (MOSELEY et al., 2007). Também é importante mencionar que a atividade da Na^+,K^+-ATPase está diminuída no cérebro post-mortem de pacientes com epilepsia (GRISAR et al., 1992) e que mutações nos genes que codificam a subunidade α estão associadas com epilepsia em humanos (JURKAT-ROTT et al., 2004). Além disso, o grau de inibição da atividade da Na^+,K^+-ATPase induzido pela administração intracerebral de ácido metilmalônico, de ácido glutárico ou injeção intraperitoneal de PTZ se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por estes agentes (FIGHERA et al., 2006; FURIAN et al., 2007; SOUZA et al., 2009), reforçando o papel importante da inibição da

atividade Na^+,K^+-ATPase nas convulsões induzidas por diversos agentes. Especialmente no que diz respeito ao ácido metilmalônico, tal correlação atinge valores impressionantes, próximos a 1 (0,994) (FURIAN et al., 2007).

3.3. Epilepsia e convulsões

Na Babilônia antiga, acreditava-se que a epilepsia era uma doença de natureza sobrenatural e, portanto, tratada como um assunto espiritual. Os diferentes tipos de epilepsia eram associados a nomes de espíritos ou deuses, geralmente do mal (MOREIRA, 2004). Em 400 a.C., Hipócrates já havia escrito um texto médico desmistificando o tema, propondo que a epilepsia não era sagrada nem divina, e sim, uma doença relacionada ao cérebro, com possível origem hereditária (MOREIRA, 2004). Atualmente, a epilepsia é um assunto desmistificado, porém, ainda é alvo de preconceito, devido a ideias controversas sobre o assunto, levando o paciente epiléptico a ser discriminado, muitas vezes, pela sociedade (CAVALHEIRO, 1988). A epilepsia é o mais comum transtorno neurológico grave, atingindo cerca de 1% da população mundial, sendo que 0.8% se encontram nos países em desenvolvimento. Pessoas de todas as raças, sexos, condições socioeconômicas e regiões são acometidas. Elas podem sofrer conseqüências profundas, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. Também à epilepsia se associam problemas sociais e econômicos (NETO & MARCHETTI, 2005).

3.3.1. Aspectos gerais

A epilepsia pode ser considerada um problema significativo de saúde pública. A presença de epilepsia é definida pela recorrência de crises epilépticas (pelo menos duas) espontâneas, não provocadas por febre, insultos agudos do SNC ou desequilíbrios tóxico-metabólicos graves (NETO &

MARCHETTI, 2005). Recentemente, novas definições para os termos crise epiléptica e epilepsia foram propostas, visando expressar o significado e as características essenciais desses dois termos. De acordo com a nova proposição, crise epiléptica é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal e excessiva ou sincrônica no cérebro. Ao passo que, o termo epilepsia refere-se a um distúrbio do cérebro, caracterizado por predispor crises epilépticas causadoras de condições neurobiológicas, cognitivas, fisiológicas e sociais que interferem negativamente na qualidade de vida (FISHER et al., 2005).

A classificação das crises epilépticas se baseia na sua descrição clínica e nos achados eletroencefalográficos: são divididas em crises parciais ou crises generalizadas. As crises parciais apresentam evidências clínicas e ou eletroencefalográficas de um início local (foco), enquanto as crises generalizadas não apresentam qualquer evidência neste sentido (manifestações clínicas e eletroencefalográficas indicam envolvimento inicial simultâneo e generalizado de ambos os hemisférios). As crises parciais são subdivididas em crises parciais simples, sem alteração da consciência, e crises parciais complexas, com alteração da consciência. As diferentes condições neurológicas que têm em comum a recorrência de crises epilépticas são organizadas e classificadas em síndromes epilépticas. Na classificação das síndromes, separam-se epilepsias generalizadas (com crises generalizadas) de epilepsias parciais ou focais (com crises parciais), que são classificadas pela topografia, por exemplo, epilepsia do lobo temporal. Em seguida, separam-se epilepsias sintomáticas ou “secundárias” (etiologia conhecida) das idiopáticas (suposta causa hereditária) e das criptogênicas (supostamente sintomáticas, mas sem etiologia conhecida) (ILAE, 1981; 1989). Os diagnósticos de crises e síndrome são necessários para a realização de tratamentos bem sucedidos. No entanto, a maioria dos estudos epidemiológicos ainda não é expressa em termos sindrômicos.

3.3.2. Epidemiologia

As taxas de incidência anual de epilepsia na maioria dos estudos oscilam entre 40 e 70/100.000, se elevando para 122 a 190/100.000 nos países em desenvolvimento. Estas altas taxas, nos países em desenvolvimento, são, em grande medida, atribuíveis a causas parasitárias (principalmente neurocisticercose), infecções intracranianas virais ou bacterianas, tocotraumatismo, traumatismo crânio-encefálico e doenças cerebrovasculares (CARPIO & HAUSER, 2009). Na maioria dos estudos internacionais, as taxas de prevalência pontual de epilepsia ativa, na população geral, ficam entre 0,4% e 1%, e as de prevalência de vida, entre 1,5% e 5% (NETO & MARCHETTI, 2005). Estudos epidemiológicos relatam também que pelo menos 10% de toda a população terão uma ou mais convulsões ao longo da vida (HAUSER et al., 1996).

A incidência da epilepsia varia com a idade, com as maiores taxas ocorrendo na infância, caindo na vida adulta e aumentando novamente por volta dos 65 anos (KRÄMER, 2001). A duração da epilepsia é freqüentemente determinada pela causa fundamental da doença, podendo ocorrer morte súbita em 1-5 pacientes por mil/ano, particularmente nos casos onde não se faz controle das crises (SURGES et al., 2009). Dentre os diferentes tipos de epilepsias, a forma mais prevalente em adultos é a do lobo temporal, ocorrendo em cerca de 40% de todos os casos de epilepsia, apresentando geralmente história de convulsão febril (WALCZAK, 1995). Neste contexto, a alta incidência e prevalência das epilepsias provocam repercussões socioeconômicas importantes, na medida em que aumentam os custos econômicos diretos, provenientes dos gastos médicos com drogas, hospitalizações e indiretos pela perda de capacidade produtiva, produção econômica por desemprego, ou morte prematura (VANCINI et al., 2008).

Após o diagnóstico clínico, os pacientes são tratados com a droga antiepiléptica ideal, de primeira escolha, de acordo com a crise convulsiva ou a síndrome epiléptica apresentada. No caso de o tratamento com a droga antiepiléptica de primeira escolha não ser efetivo, o médico ainda tem a escolha de alterar as doses ou o intervalo de administração da droga. Ainda

assim, no caso de insucesso no tratamento, existe a possibilidade da utilização de drogas alternativas, para os determinados tipos de manifestação. Se, mesmo após o tratamento medicamentoso o paciente não responder e as crises epilépticas continuarem não controladas, ele é classificado como paciente com epilepsia refratária. O sucesso com a terapia das drogas antiepilépticas se aproxima de 70% dos pacientes. Entretanto, cerca de 30% dos pacientes são classificados como refratários e, muitas vezes, não responsivos em mais de 3 tentativas terapêuticas, com drogas antiepilépticas diferentes. Neste caso, terapias alternativas podem ser adotadas, como a cirurgia do foco epiléptico, dieta cetogênica, estimulação do nervo vago, ou outras terapias menos convencionais (SHNEKER & FOUNTAIN, 2003). Uma vez que um grande número de pacientes com epilepsia permanece refratário e não responsivo ao tratamento medicamentoso, surge a importância do estudo e do compreendimento da fisiopatologia dos diferentes tipos de crises convulsivas e de síndromes epilépticas, para assim, sugerir novas terapias, ou mesmo testar novas drogas com potencial anticonvulsivante. Neste sentido, os modelos experimentais são de grande valia para a o estudo da fisiopatologia envolvida nestas manifestações, assim como para a identificação de novas drogas com valor preditivo antiepiléptico.

3.3.3. Modelos experimentais

Os modelos experimentais são essenciais para o compreendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos nos diferentes tipos de manifestações epiléticas e convulsivas, uma vez que conseguem reproduzir, pelo menos em parte, as manifestações humanas. Além disso, os modelos experimentais são essenciais para a identificação de novas drogas com potencial antiepiléptico.

Para um melhor compreendimento dos modelos experimentais, cabe dividi-los em modelos *in vivo* e *in vitro*. Os modelos experimentais são conhecidos, também, pelo tipo de síndrome ou crise epiléptica que produzem, sendo classificados em focais e generalizados. Dentre os modelos *in vivo*, de convulsão generalizada, destaca-se o modelo de convulsão induzido por PTZ,

um antagonista de receptores $GABA_A$ que, por inibir as correntes de cloreto associadas a este mesmo canal, potencializa a neurotransmissão excitatória e desencadeia convulsões. É amplamente utilizado em testes para identificação de novas drogas com valor preditivo antiepiléptico, juntamente com outros testes, como o teste do eletrochoque máximo (KUPFERBERG, 2001). Um modelo clássico de convulsão focal é o da injeção de penicilina em áreas específicas do cérebro de animais, o que permite o estudo das convulsões de natureza focal (MATSUMOTO, 1964). Outro modelo de epilepsia de natureza focal que merece destaque são os modelos de epilepsia do lobo temporal mesial, com foco em regiões límbicas, principalmente no hipocampo (LOTHMAN et al., 1995). Destacam-se, entre os modelos focais (parciais), o modelo do abrasamento (kindling) elétrico, o da pilocarpina e o do ácido caínico. Para os modelos *in vitro* são utilizadas as técnicas de exposição a altas concentrações de K^+ (DUDEK et al., 1994), aplicação de antagonistas GABAérgicos (TASKER & DUDDEK, 1991) e redução nas concentrações de Mg^{2+} (MODY et al., 1987).

CAPÍTULO I

4. ARTIGO CIENTÍFICO

4. ARTIGO CIENTÍFICO

4.1. Aumento na atividade da Na^+,K^+-ATPase hipocampal pela creatina: ação mediada por função glutamatérgica

Manuscrito submetido para publicação no periódico European Journal of Pharmacology.

INCREASE OF HIPPOCAMPAL Na^+,K^+-ATPase ACTIVITY BY CREATINE: ACTION MEDIATED BY GLUTAMATERGIC FUNCTION

Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Vanessa Grigoletto Schramm, Andriely Moreira Berch, Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Luiz Fernando Freire Royes

INCREASE OF HIPPOCAMPAL Na^+,K^+-ATPase ACTIVITY BY CREATINE: ACTION MEDIATED BY GLUTAMATERGIC FUNCTION

Leonardo Magno Rambo[1,3], Leandro Rodrigo Ribeiro[1,3], Vanessa Grigoletto Schramm[1], Andriely Moreira Berch[1], Ana Flávia Furian[1,2], Mauro Schneider Oliveira[1,2], Luiz Fernando Freire Royes[1,3]*

[1] Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

[2] Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

[3] Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* Corresponding author: Luiz Fernando Freire Royes, Dr
Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas,
Centro de Educação Física e Desportos.
Universidade Federal de Santa Maria,
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.
FAX: +55 55 3220 8031
e-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

Abstract: Achievements made over the last years have demonstrated the important role of creatine (Cr) and Phosphocreatine (PCr) system in the buffering and transport of high-energy phosphates in the brain, however, growing evidences indicate that this guanidine compound may act as a neuromodulator as well, particularly by increasing the glutamatergic function. N-methyl-$_D$-aspartate (NMDA) glutamate receptor activation modulates neuronal Na^+,K^+-ATPase activity by a complex and not completely understood cascade of regulatory proteins. In the present study, we revealed that incubation of rat hippocampal slices with creatine (10 mM) for 30 min increased $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity and that hippocampal slices incubated with PCr and Creatinine (0.1 to 10 mM) had no effect on Na^+,K^+-ATPase activity. Statistical analysis also revealed that the intrahippocampal injection of Cr (5nmol/site) increased Na^+,K^+-ATPase activity confirming the results *in vitro*. However, Cr did not alter Na^+,K^+-ATPase activity in hippocampal homogenates suggesting the requirement of an intact cellular system. The incubation of hippocampal slices with NMDA (MK-801, 10 μM) and NR2B (ifenprodil, 3 μM) antagonists, but not with the NOS inhibitor (L-NAME, 100 μM), reverted the effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity. The calcineurin inhibitor (cyclosporine A, 200 nM) as well as the PKC (PMA, 100 nM) and PKA (8-Br-cAMP, 30 μM) activators attenuated the creatine-induced increase of Na^+,K^+-ATPase activity. These data suggest that Cr may modulate neuronal Na^+,K^+-ATPase enzyme by the stimulation of NMDA/NR2B receptors, which activate calcineurin. This phosphatase, in turn, counteracts the PKC- and PKA-mediated phosphorylation of Na^+,K^+-ATPase leading to the stimulation of $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity.

Key words: Creatine, sodium pump, calcineurin, NMDA receptors.

1. Introduction

Creatine (N-[aminoiminomethyl]-N-methyl glycine) is a guanidine compound synthesized in the kidneys, liver, pancreas, and brain or obtained from alimentary sources like meat and fresh fish (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Experimental and clinical findings indicate that creatine-induced phosphate maintenance protects against ATP depletion in a number of pathological conditions including Alzheimer (Burklen et al., 2006), Parkinson (Bender et al., 2006, 2008) and Huntington's diseases (Ferrante et al., 2000, Ryu et al., 2005, Hersch et al., 2006), Amyotrophic Lateral Sclerosis (Ellis and Rosenfeld, 2004, Shefner et al., 2004, Rosenfeld et al., 2008), and Traumatic Brain Injury (Rabchevsky et al., 2003, Scheff and Dhillon, 2004, Sakellaris et al., 2006.

Although it is believed that the mechanisms of neuronal function improvement and neuroprotection exerted by Cr include enhanced energy buffering, a direct neuromodulatory role for creatine has also been proposed (Persky and Brazeau, 2001). It has been showed that Cr is not only synthesized and taken up by neurons, but also released in an action potential-dependent manner (Almeida et al., 2006). The bath application of creatine increased the population spike amplitude and number in the stratum radiatum of the hippocampal CA1 subfield, an effect reverted by the selective NMDA receptor antagonist 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) (Royes et al., 2008). In line with this view, Cr increases [^{3}H]MK-801 binding to hippocampal membranes by 55% (Royes et al., 2008) and leads to spatial learning improvement possibly by modulating polyamine binding site at the NMDA receptor (Oliveira et al., 2008). However, the downstream effectors of the creatine-induced modulation of the NMDA receptor are still unknown.

NMDA receptor stimulation leads to the activation of Na^+,K^+-ATPase, a key enzyme involved in the transmembrane transport of sodium and potassium which plays a pivotal role in the cellular ionic gradient maintenance (Skou and Esmann, 1992) and may be modulated by a complex and not completely understood phosphorylation cascade of regulatory proteins. PKA activators, such as forskolin and Sp-5,6-DCI-cBIMPS as well as the PKC activator phorbol 12,13-dibutyrate significantly reduce Na^+,K^+-ATPase activity in neurons or COS cells (Cheng et al., 1997a, 1999, Nishi et al., 1999a). On the other hand, the α-

adrenergic receptor activation increases Na^+,K^+-ATPase activity through the activation of the calcium-dependent protein phosphatase 2B and calcineurin (Aperia et al., 1992). The glutamate-induced calcineurin activation counteracts the PKC-mediated phosphorylation of Na^+,K^+-ATPase leading to an increased pump activity (Marcaida et al., 1996). Therefore, since Cr may play a putative role as a neuromodulator in the brain (Almeida et al., 2006; Royes et al., 2008; Oliveira et al., 2008) and glutamatergic agonists, such as NMDA increase Na^+,K^+-ATPase activity in cultured neurons (Inoue et al., 1999), we investigated whether creatine alters Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices. Furthermore, given that PKA and PKC are major downstream kinases involved in the Na^+,K^+-ATPase activity regulation (Nishi et al., 1999, Cheng et al., 1999), we also investigated whether they are involved in the effect exerted by Cr .

2. Materials and methods

2.1 Animals and reagents

Adult male Wistar rats (250–300 g) maintained under controlled light and environment (12 h light/dark cycle, 24±1 ℃, 55% relative humidity) with free access to food and water were used. Animal utilization reported in this study was conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and with the Institutional and National regulations for animal research. All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimize their suffering.

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was dissolved in 100% ethanol and then diluted with aCSF (artificial cerebrospinal fluid) in such a way that ethanol concentration did not exceed 0.006 %. Creatine, creatinine, phosphocreatine, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), (5R,10S)-(+)5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK-801), ifenprodil, PMA, 8-Bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP), cyclosporin A and all other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and solutions were prepared in aCSF.

2.2 In situ experiments

Animals were sacrificed by decapitation and the hippocampus was immediately dissected and used for the preparation of slices (400 µm thick) with a McIlwain tissue chopper. Slices were suspended in a pregassed (carbogen) aCSF containing (in mM): 1.25 NaH_2PO_4; 22 NaH_2CO_3; 1.8 $MgSO_4$; 129.0 NaCl; 1.8 $CaCl_2$; 3.5 KCl; and 10 D-glucose. pH was adjusted to 7.4 with carbogen. The viability of hippocampal slices was assessed at 0, 30, 60 and 90 min after preparation by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity with a standard commercial kit (Labtest, Porto Alegre, RS, Brasil). Considering that the hippocampal slices were viable for more than 60 min after preparation, all experiments were performed within this time window (data not shown).

The effect of Cr on hippocampal Na^+,K^+-ATPase activity was investigated by incubating 10-12 slices for 30 min at 37°C with increasing concentrations of Cr (0, 0.1, 1 or 10 mM). The concentrations of Cr used in the current study were chosen based on previous studies that have demonstrated an excitatory action of creatine on hippocampal slices (Royes et al., 2008) as well as because they are comparable to creatine doses used in previous in vivo studies (Oliveira et al., 2008). To test the effect of PCr or creatinine on Na^+,K^+-ATPase activity, hippocampal slices were incubated with increasing concentrations (0, 0.1, 1 or 10 mM) of either phosphocreatine or creatinine. The role of NMDA receptors in the increase of the Cr-induced Na^+,K^+-ATPase activity was studied by incubating hippocampal slices with MK-801 (10 µM) or ifenprodil (3 µM). The effect of nitric oxide synthase (NOS) on the Cr-induced increase of Na^+,K^+-ATPase activity was tested by incubating hippocampal slices with L-NAME (100 µM). To investigate the role of PKA/PKC and calcineurin in the Cr-induced increase of Na^+,K^+-ATPase activity, we incubated hippocampal slices with PMA (100 nM), 8-Br-cAMP (30 µM) or cyclosporin A (200 nM).

After the incubation period, the medium was discarded and slices were gently homogenized (7-10 strokes) in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na^+,K^+-ATPase activity. In a separate set of experiments, designed to determine whether Cr increased Na^+,K^+-ATPase activity by directly interacting with the enzyme, Cr (10 mM) was added directly to the reaction medium containing hippocampal homogenates.

2.3 Na^+,K^+-ATPase activity measurements

Na^+,K^+-ATPase activity was measured according to Wyse et al. (2000). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$ and 50 µg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 350 µL. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 µL of 50 % (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), using KH_2PO_4 as reference standard. Specific Na^+,K^+-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

In a separate set of experiments, we investigated whether some Na^+,K^+-ATPase α isoforms are selectively modulated by Cr. For this purpose, we used a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al., 1999a). We determined whether Cr increased ouabain-sensitive ATPase activity using 3 µM (that inhibits Na^+,K^+-ATPase isoforms containing α_2 and α_3 subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms).

2.4 In vivo experiments

To determine whether the Cr-induced increase on Na^+,K^+-ATPase activity also occurred in vivo, animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, and 11% ethanol, 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Two cannula were inserted 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus, bilaterally (coordinates relative to bregma: AP 4 mm, ML 3 mm, V 2 mm from the dura) under stereotaxic guidance (Paxinos and Watson, 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. Three days after the surgical procedure, animals were transferred to a round open field (54.7 cm in diameter) and habituated for 20

min before Cr administration. After the habituation period, the animals were injected with Cr (5 nmol/0.5 µL, i.c.v.) or vehicle and 30 min thereafter animals were sacrificed. The hippocampi were rapidly removed and gently homogenized (7-10 strokes) in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 and Na^+,K^+-ATPase activity measured as described above. Doses of Cr used in this set of experiments were chosen based on previous studies (Oliveira et al., 2008) and are comparable to the concentrations of Cr used in the in situ experiments.

2.5 Protein determination

The protein content was colorimetrically determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

2.6 Statistical analyses

Data were analyzed by a one- or two-way ANOVA and post hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls test, when appropriate. A probability of $P<0.05$ was considered significant. All data are expressed as mean + S.E.M.

3. Results

Figure 1A shows the effect of Cr (0, 0.1, 1 or 10 mM) on Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices. Statistical analysis revealed that the incubation with Cr (10 mM) increased Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices [$F(3,32)=2.99$; $p<0.05$]. To determine the effect of Cr in a cell free system, we added creatine directly to hippocampal homogenates. In this experimental condition, Cr (10 mM) did not alter Na^+,K^+-ATPase activity [$F(1,8)=0.47$; $P>0.05$] (Figure 1B), suggesting that Cr-induced increase of Na^+,K^+-ATPase activity requires an intact cellular system. We also investigated whether some α isoforms are selectively activated by Cr, by using a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain concentration (Nishi et al., 1999a). We found that the stimulatory effect of Cr on Na^+,K^+-ATPase activity is specific for $\alpha_{2/3}$ isoform, since the effect of Cr on the

enzyme activity was not observed in the presence of 3 μM ouabain (it inhibits $\alpha_{2/3}$, but not α_1 isoforms) [$F(2,20)=138.77$; $P<0.05$] (Figure 1C). In order to determine whether the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity occurred in vivo, animals were injected with Cr (5 nmol/site, intrahippocampal) and Na^+,K^+-ATPase activity was determined in the hippocampus. Statistical analysis revealed that the intrahippocampal injection of Cr (5 nmol/site) increased Na^+,K^+-ATPase activity by 21% in the hippocampus [$F(1,18)=7.03$; $P<0.05$] (Figure 1D), confirming the results obtained in situ. No effects of creatine on the animal behavior were observed.

To test whether the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity was due to its conversion to its phosphorylated form (PCr) or to its main metabolite (creatinine), hippocampal slices were incubated with increasing concentrations of PCr (0, 0.1, 1 or 10 mM) or creatinine (0, 0.1, 1 or 10 mM). In our experimental conditions, both PCr [$F(3,20)=0.81$; $P>0.05$] and creatinine [$F(3,20)=0.74$; $P>0.05$] (Figure 2A and 2B, respectively) had no effect on Na^+,K^+-ATPase activity.

NMDA receptors appear to be involved in the Cr-induced learning facilitation (Oliveira et al., 2008), as well as in the population spike amplitude and number increase induced by this compound (Royes et al., 2008). NMDA receptors regulate Na^+,K^+-ATPase activity (Marcaida et al., 1996). The role of NMDA receptors in the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity was investigated by incubating hippocampal slices with Cr (10 mM) and the selective NMDA receptor antagonist MK-801 (10 μM). We found that Cr (10 mM) increases Na^+,K^+-ATPase activity and that the co-incubation of Cr plus MK-801 prevented such increase [$F(3,20)=5.75$; $P<0.05$] (Figure 3A). In addition, the role of NR2B subunit of NMDA receptor in the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity was investigated by incubating hippocampal slices with Cr (10 mM) and the selective antagonist for NR2B subunit ifenprodil (3 μM). Statistical analysis revealed that ifenprodil blunted the effect of Cr on Na^+,K^+-ATPase activity [$F(3,28)=6.42$; $P<0.05$] (Figure 3B). Considering the functional coupling between NR2B subunit and nitric oxide synthases (NOS) (Loftis and Janowsky, 2003) and that NMDA-NOS pathway may regulate Na^+,K^+-ATPase activity (Munhoz et al., 2005), we decided to investigate whether nitric oxide (NO) plays a role on Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity. For this purpose,

hippocampal slices were incubated with Cr (10 mM) in the absence or presence of the isoform inespecific NOS inhibitor L-NAME (100 μM). In our experimental conditions, L-NAME did not alter Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity [$F(3,24)=0.82$; $P>0.05$] (Figure 3C).

Since NMDA receptors activate PKA and PKC pathways and these protein kinases are involved in the regulation of Na^+,K^+-ATPase activity (Bertorello et al., 1991, Aperia et al., 1992, Marcaida et al., 1996, Blanco and Mercer, 1997, Cheng et al., 1999, Nishi et al., 1999a), we have also investigated the role of these protein kinases in the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity. We found that incubation with a PKC activator (PMA; 100 nM) attenuated the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity [$F(3,32)=4.79$; $P<0.05$] (Figure 4A). In addition, the PKA activator (8-Br-cAMP; 30 μM) also attenuated the effect of Cr on the Na^+,K^+-ATPase activity [$F(3,20)=4.47$; $P<0.05$] (Figure 4B). Considering that calcineurin-dependent Na^+-K^+-ATPase dephosphorylation is also a critical event in the Na^+,K^+-ATPase activity regulation (Bertuccio et al., 2003, 2007), we decided to test the effect of a calcineurin inhibitor (cyclosporin A; 200 nM) in the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity. Statistical analysis revealed that cyclosporin A attenuated the stimulatory effect of Cr on Na^+,K^+-ATPase activity [$F(3,20)=7.08$; $P<0.05$] (Figure 4C).

4. Discussion

In the current study we showed that the incubation with Cr increases Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices and that this effect is $\alpha_{2/3}$ isoform-specific. The stimulatory effect of this guanidine compound was not observed in hippocampal homogenates, indicating that it requires an intact cellular system. Regarding this point, it is also possible that tissue homogenizing disrupts critical anchoring protein linkages between NMDA receptors, kinases, and Na^+,K^+-ATPase, resulting in the uncoupling of enzyme modulatory components. On the other hand, NMDA receptors, more specifically NR2B subunit and subsequent calcineurin, but not NOS activation, are involved in the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices. Our results also evidenced that the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase

activity, independently of changes in the bioenergetic status of the hyppocampus, since its conversion to phosphorylated form (PCr) or its metabolite (creatinine) showed no effect on Na^+,K^+-ATPase activity. In addition, PKA and PKC activators attenuated the effect of Cr on Na^+,K^+-ATPase activity. Importantly, we also showed that Cr increases Na^+,K^+-ATPase activity *in vivo*.

There are many studies showing the beneficial effects of Cr in a variety of experimental models of neurological diseases. Besides, its role as an energetic buffer has been claimed as a major underlying mechanism to explain such neuroprotective effects (Royes et al., 2003, 2006, Sakellaris et al., 2006, Klein and Ferrante, 2007, Magni et al., 2007, Adhihetty and Beal, 2008). Regarding this assumption, a growing number of reports have proposed alternative non-energetic effects of Cr. Prass and co-workers (2007) showed that creatine augmented cerebral blood flow after stroke, independently of changes in the bioenergetic status of the brain tissue. In addition, it has been shown that Cr reduces inhibitory GABA and glycine responses in mouse neurons in cell culture (De Deyn and Macdonald, 1990) and that this compound is not only synthesized by central neurons, but also released in an action-potential dependent (exocytotic) manner (Almeida et al., 2006). These experimental findings suggest that Cr interacts with a variety of neurotransmitter systems in the brain and could act as a neuromodulator in this tissue.

Accordingly, there is also evidence that at least some of its effect may be mediated by an increase in glutamatergic function, since Cr-induced increase in population spike number and amplitude in hippocampal slices is blunted by the NMDA antagonist AP5 (Royes et al., 2008). In line with this view, recent experimental findings from our group have shown the participation of the polyamine binding site at NMDA receptors on Cr-elicited learning and memory improvement, since the Cr-induced spatial learning enhancement was reverted by co-administration of arcaine and intensified by spermidine (Oliveira et al., 2008). In agreement with a modulatory effect of Cr on the NMDA receptors, our data revealed that incubating hippocampal slices with MK-801, a selective NMDA receptor antagonist, attenuated the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices. Furthermore, incubation with ifenprodil, a selective antagonist of NMDA receptors containing the NR2B subunit, also reverted the effect of Cr on Na^+,K^+-ATPase activity. These data

suggest that the stimulatory effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity is dependent of NMDA/NR2B activation. However, further studies are necessary to determine the exact mechanisms involved in this activation.

An intracellular pathway proposed to be involved in such effect is the glutamate-NMDA-NOS-cGMP-PKG pathway, which, in turn, stimulates $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity (Munhoz et al., 2005). To test whether the creatine-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity occurred through NOS activation, we tested the possibility of L-NAME, a nonspecific NOS inhibitor, block the effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices. We found that L-NAME did not blunt the creatine-induced increase of Na^+,K^+-ATPase, indicating that another intracellular pathway activated by NMDA receptors could be responsible for the stimulatory effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity.

In order to test whether creatine would affect any α isoform in particular, we used a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al., 1999a). Our results suggest that Cr induces an increase of Na^+,K^+-ATPase activity by $\alpha_{2/3}$ isoform-specific activation. In the brain, α_2 and α_3 isoforms are found in glial and neuronal cells, respectively, contributing to membrane potential generation control, K^+ re-uptake after depolarization and therefore maintaining neuronal excitability (Lecuona et al., 1996, Peng et al., 1997, Mobasheri et al., 2000). As a consequence, a decrease of Na^+,K^+-ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as animal behavior. Accordingly, the Na^+,K^+-ATPase inhibitor ouabain increases Ca^{2+} entry into brain slices (Fujisawa et al., 1965), causes electrographically recorded seizures in mice (Jamme et al., 1995), glutamate release by reversal of Na^+-dependent transporter in the rat spinal cord (Li and Stys, 2001), and cell death in rat hippocampus (Lees et al., 1990). Moreover, genetic suppression of Na^+,K^+-ATPase activity impairs spatial learning (Moseley et al., 2007). Thus, creatine-induced stimulation of $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity may be a possible alternative non-energetic mechanism for neuroprotective effects of this compound in neurological diseases.

Many intracellular pathways may regulate Na^+,K^+-ATPase activity, including calcineurin activation. In fact, it has been proposed that α-adrenergic receptor stimulation activates calcineurin leading to increased Na^+,K^+-ATPase activity in renal tubular cells (Aperia et al., 1992). In the same way, calcineurin-

induced dephosphorylation of Na^+,K^+-ATPase is the mechanism for the stimulatory effect of norepinephrine on Na^+,K^+-ATPase activity in rat brain (Mallick et al., 2000). Accordingly, it is well known that NMDA stimulation activates calcineurin in different brain structures including rat hippocampal and striatal slices (Halpain et al., 1990, Halpain and Greengard, 1990). Furthermore, NMDA and calcineurin activation by glutamate in cerebellar neuron culture leads to stimulation of Na^+,K^+-ATPase (Marcaida et al., 1996).

In agreement with these results, we showed that Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity was attenuated by incubation with cyclosporin A, a calcineurin inhibitor. Calcineurin-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity can occur in two ways: directly, by counteracting the PKC-mediated phosphorylation of Na^+,K^+-ATPase through dephosphorylation of the Ser-23 in the α subunit (Bertuccio et al., 2003, 2007) or indirectly, by dephosphorylation of the phosphorylation site for PKA (Thr-34) in the dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) (Nishi et al., 1999b). We found that the incubation with the PKC activator PMA or the PKA activator 8-Br-cAMP prevented the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity, indicating that both PKC and PKA are involved in the effect of creatine on Na^+,K^+-ATPase activity. These results suggest that the major underlying mechanism for the Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices is the activation NMDA/NR2B receptors, which activate calcineurin. In addition, this phosphatase, in turn, counteracts the PKC- and PKA-mediated phosphorylation of Na^+,K^+-ATPase leading to the stimulation of $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity.

In summary, in this study we showed that incubation with Cr increases $\alpha_{2/3}$ Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampal slices and that the i.c.v. injection of this compound increases Na^+,K^+-ATPase activity *in vivo*. The mechanisms involve NMDA-NR2B receptors and calcineurin activation. We also found that PKC and PKA are involved in the effect of Cr. Considering the fundamental importance of Na^+,K^+-ATPase in the brain, Cr-induced increase in Na^+,K^+-ATPase activity suggests a possible alternative non-energetic mechanism by which creatine promotes neuroprotection in several neurological diseases.

Acknowledgements

Work supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Grant: 01.06.0842-00) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant: 500120/2003-0). C.F. Mello and A.F. Furian are the recipients of CNPq fellowships. L.M. Rambo and M.S. Oliveira are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships.

5. References

Adhihetty P. J. and Beal M. F. (2008) Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. Neuromolecular medicine 10, 275-290.

Almeida L. S., Salomons G. S., Hogenboom F., Jakobs C. and Schoffelmeer A. N. (2006) Exocytotic release of creatine in rat brain. Synapse (New York, N.Y 60, 118-123.

Aperia A., Ibarra F., Svensson L. B., Klee C. and Greengard P. (1992) Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na+,K(+)-ATPase activity in renal tubule cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 7394-7397.

Bender A., Samtleben W., Elstner M. and Klopstock T. (2008) Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with Parkinson disease. Nutrition research (New York, N.Y 28, 172-178.

Bender A., Koch W., Elstner M., Schombacher Y., Bender J., Moeschl M., Gekeler F., Muller-Myhsok B., Gasser T., Tatsch K. and Klopstock T. (2006) Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. Neurology 67, 1262-1264.

Bertorello A. M., Aperia A., Walaas S. I., Nairn A. C. and Greengard P. (1991) Phosphorylation of the catalytic subunit of Na+,K(+)-ATPase inhibits the activity of the enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 11359-11362.

Bertuccio C. A., Arrizurieta E. E., Ibarra F. R. and Martin R. S. (2007) Mechanisms of PKC-dependent Na+ K+ ATPase phosphorylation in the rat kidney with chronic renal failure. Renal failure 29, 13-22.

Bertuccio C. A., Cheng S. X., Arrizurieta E. E., Martin R. S. and Ibarra F. R. (2003) Mechanisms of Na+-K+-ATPase phosphorylation by PKC in the medullary thick ascending limb of Henle in the rat. Pflugers Arch 447, 87-96.

Blanco G. and Mercer R. W. (1997) Regulation of the alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 isozymes of the Na,K-ATPase by Ca2+, PKA, and PKC. Annals of the New York Academy of Sciences 834, 572-575.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.

Burklen T. S., Schlattner U., Homayouni R., Gough K., Rak M., Szeghalmi A. and Wallimann T. (2006) The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. Journal of biomedicine & biotechnology 2006, 35936.

Cheng S. X., Aizman O., Nairn A. C., Greengard P. and Aperia A. (1999) [Ca2+]i determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na+,K+-ATPase. The Journal of physiology 518 (Pt 1), 37-46.

Cheng X. J., Hoog J. O., Nairn A. C., Greengard P. and Aperia A. (1997a) Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. The American journal of physiology 273, C1981-1986.

Cheng X. J., Fisone G., Aizman O., Aizman R., Levenson R., Greengard P. and Aperia A. (1997b) PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. The American Journal of Physiology 273, C893-901.

De Deyn P. P. and Macdonald R. L. (1990) Guanidino compounds that are increased in cerebrospinal fluid and brain of uremic patients inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. Annals of Neurology 28, 627-633.

Ellis A. C. and Rosenfeld J. (2004) The role of creatine in the management of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. CNS drugs 18, 967-980.

Ferrante R. J., Andreassen O. A., Jenkins B. G., Dedeoglu A., Kuemmerle S., Kubilus J. K., Kaddurah-Daouk R., Hersch S. M. and Beal M. F. (2000) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. J Neuroscience 20, 4389-4397.

Fiske C. H. and Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. Journal of Biological Chemistry 66, 375-400.

Fujisawa H., Kajikawa K., Ohi Y., Hashimoto Y., Yoshida H. (1965) Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. Japanese Journal of Pharmacology 15, 327-334.

Halpain S. and Greengard P. (1990) Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. Neuron 5, 237-246.

Halpain S., Girault J. A. and Greengard P. (1990) Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. Nature 343, 369-372.

Hersch S. M., Gevorkian S., Marder K., Moskowitz C., Feigin A., Cox M., Como P., Zimmerman C., Lin M., Zhang L., Ulug A. M., Beal M. F., Matson W., Bogdanov M., Ebbel E., Zaleta A., Kaneko Y., Jenkins B., Hevelone N., Zhang H., Yu H., Schoenfeld D., Ferrante R. and Rosas H. D. (2006) Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. Neurology 66, 250-252.

Inoue N., Soga T., Kato T. (1999) Glutamate receptors mediate regulation of Na pump isoform activities in neurons. Neuroreport 10, 3289-3293.

Inoue N. and Matsui H. (1990) Activation of a brain type Na pump after glutamate excitation of cerebral neurons. Brain Research 534, 309-312.

Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J. M., Nouvelot A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na+,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. Neuroreport 7, 333-337.

Klein A. M. and Ferrante R. J. (2007) The neuroprotective role of creatine. Sub-cellular biochemistry 46, 205-243.

Kwon Y. G., Huang H. B., Desdouits F., Girault J. A., Greengard P. and Nairn A. C. (1997) Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 3536-3541.

Lecuona E., Luquin S., Avila J., Garcia-Segura L. M. and Martin-Vasallo P. (1996) Expression of the beta 1 and beta 2(AMOG) subunits of the Na,K-ATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns. Brain research bulletin 40, 167-174.

Lees G. J., Lehmann A., Sandberg M., Hamberger A. (1990) The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. Neuroscience Letters 120, 159-162.

Li S. and Stys P. K. (2001) Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. Neuroscience 107, 675-683.

Loftis J. M. and Janowsky A. (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. Pharmacology & therapeutics 97, 55-85.

Logvinenko N. S., Dulubova I., Fedosova N., Larsson S. H., Nairn A. C., Esmann M., Greengard P. and Aperia A. (1996) Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na+,K(+)-ATPase affects its conformational equilibrium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 9132-9137.

Magni D. V., Oliveira M. S., Furian A. F., Fiorenza N. G., Fighera M. R., Ferreira J., Mello C. F. and Royes L. F. (2007) Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. Brain research 1185, 336-345.

Mallick B. N., Adya H. V. and Faisal M. (2000) Norepinephrine-stimulated increase in Na+, K+-ATPase activity in the rat brain is mediated through alpha1A-adrenoceptor possibly by dephosphorylation of the enzyme. Journal of neurochemistry 74, 1574-1578.

Marcaida G., Kosenko E., Minana M. D., Grisolia S. and Felipo V. (1996) Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na+,K(+)-

ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. Journal of neurochemistry 66, 99-104.

Mobasheri A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M. D., Trevan M., Francis M. J., Lamb J. F. and Martin-Vasallo P. (2000) Na+, K+-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Bioscience reports 20, 51-91.

Moseley A. E., Williams M. T., Schaefer T. L., Bohanan C. S., Neumann J. C., Behbehani M. M., Vorhees C. V., Lingrel J. B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. The Journal of Neuroscience 27, 616-626.

Munhoz C. D., Kawamoto E. M., de Sa Lima L., Lepsch L. B., Glezer I., Marcourakis T. and Scavone C. (2005) Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. Cell biochemistry and function 23, 115-123.

Nishi A., Snyder G. L., Nairn A. C. and Greengard P. (1999a) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. Journal of neurochemistry 72, 2015-2021.

Nishi A., Fisone G., Snyder G. L., Dulubova I., Aperia A., Nairn A. C. and Greengard P. (1999b) Regulation of Na+, K+-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. Journal of neurochemistry 73, 1492-1501.

Oliveira M. S., Furian A. F., Fighera M. R., Fiorenza N. G., Ferreira J., Rubin M. A., Mello C. F. and Royes L. F. (2008) The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. Behavioural brain research 187, 200-204.

Paxinos G. and Watson C. (1986) The rat brainin stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego

Peng L., Martin-Vasallo P. and Sweadner K. J. (1997) Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. J Neurosci 17, 3488-3502.

Persky A. M. and Brazeau G. A. (2001) Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. Pharmacological reviews 53, 161-176.

Prass K., Royl G., Lindauer U., Freyer D., Megow D., Dirnagl U., Stockler-Ipsiroglu G., Wallimann T. and Priller J. (2007) Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. J Cereb Blood Flow Metab 27, 452-459.

Rabchevsky A. G., Sullivan P. G., Fugaccia I. and Scheff S. W. (2003) Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. Journal of neurotrauma 20, 659-669.

Rosenfeld J., King R. M., Jackson C. E., Bedlack R. S., Barohn R. J., Dick A., Phillips L. H., Chapin J., Gelinas D. F. and Lou J. S. (2008) Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. Amyotroph Lateral Scler 9, 266-272.

Royes L. F., Fighera M. R., Furian A. F., Oliveira M. S., Myskiw Jde C., Fiorenza N. G., Petry J. C., Coelho R. C. and Mello C. F. (2006) Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. Pharmacology, biochemistry, and behavior 83, 136-144.

Royes L. F., Fighera M. R., Furian A. F., Oliveira M. S., da Silva L. G., Malfatti C. R., Schneider P. H., Braga A. L., Wajner M. and Mello C. F. (2003) Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. Neuroscience 118, 1079-1090.

Royes L. F., Fighera M. R., Furian A. F., Oliveira M. S., Fiorenza N. G., Ferreira J., da Silva A. C., Priel M. R., Ueda E. S., Calixto J. B., Cavalheiro E. A. and Mello C. F. (2008) Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. Neurochemistry international 53, 33-37.

Ryu H., Rosas H. D., Hersch S. M. and Ferrante R. J. (2005) The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. Pharmacology & therapeutics 108, 193-207.

Sakellaris G., Kotsiou M., Tamiolaki M., Kalostos G., Tsapaki E., Spanaki M., Spilioti M., Charissis G. and Evangeliou A. (2006) Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. The Journal of trauma 61, 322-329.

Scheff S. W. and Dhillon H. S. (2004) Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. Neurochemical research 29, 469-479.

Shefner J. M., Cudkowicz M. E., Schoenfeld D., Conrad T., Taft J., Chilton M., Urbinelli L., Qureshi M., Zhang H., Pestronk A., Caress J., Donofrio P., Sorenson E., Bradley W., Lomen-Hoerth C., Pioro E., Rezania K., Ross M., Pascuzzi R., Heiman-Patterson T., Tandan R., Mitsumoto H., Rothstein J., Smith-Palmer T., MacDonald D. and Burke D. (2004) A clinical trial of creatine in ALS. Neurology 63, 1656-1661.

Therien A. G. and Blostein R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. American journal of physiology 279, C541-566.

Wyse A. T., Streck E. L., Barros S. V., Brusque A. M., Zugno A. I. and Wajner M. (2000) Methylmalonate administration decreases Na+,K+-ATPase activity in cerebral cortex of rats. Neuroreport 11, 2331-2334.

Wyss M. and Kaddurah-Daouk R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. Physiological reviews 80, 1107-1213.

Zhu S., Li M., Figueroa B. E., Liu A., Stavrovskaya I. G., Pasinelli P., Beal M. F., Brown R. H., Jr., Kristal B. S., Ferrante R. J. and Friedlander R. M. (2004) Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. J Neurosci 24, 5909-5912.

Figures legends

Figure 1

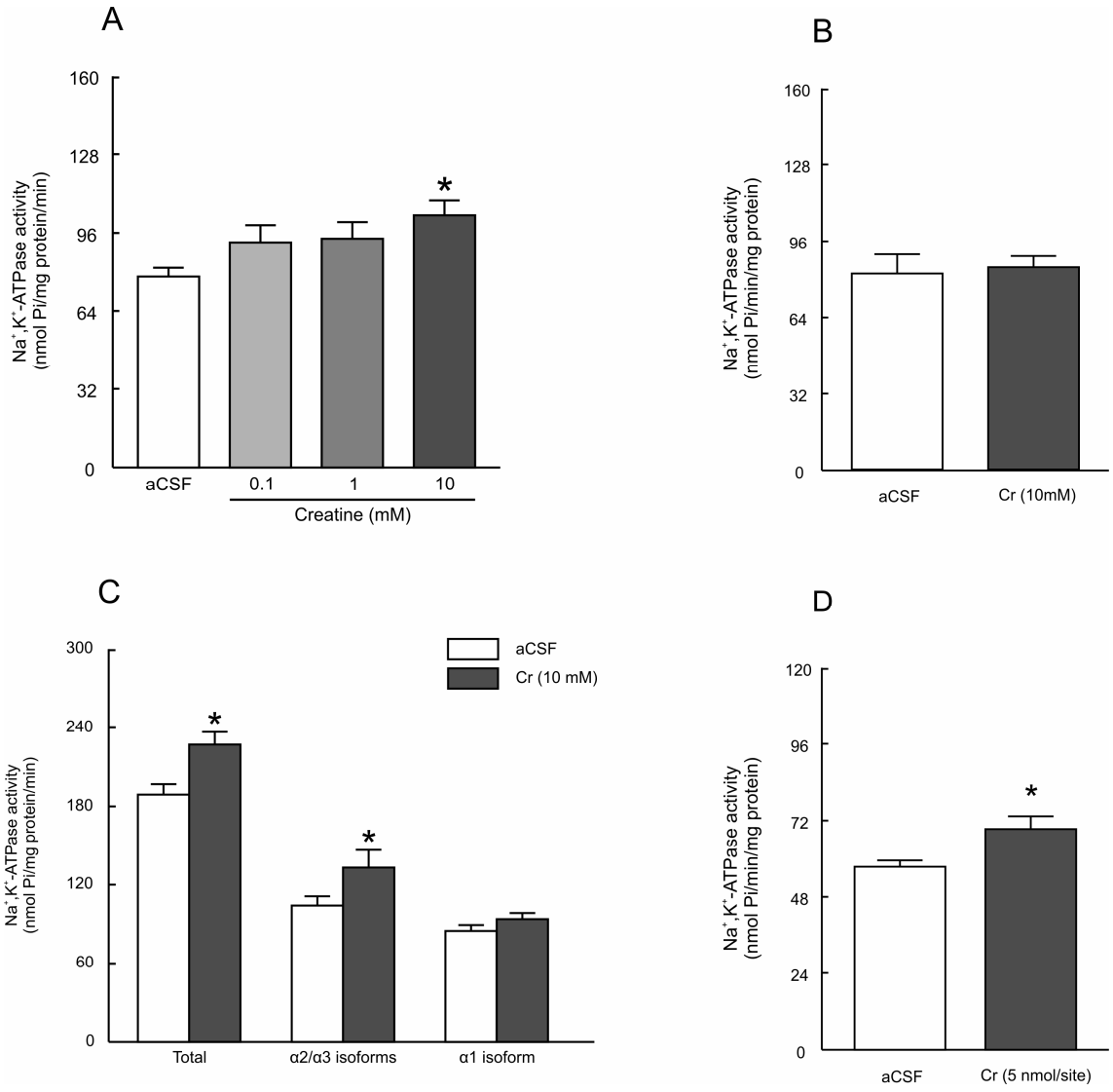


Figure 1: Effect of creatine (0, 0.1, 1 or 10 mM) on Na^+,K^+-ATPase activity of rat hippocampal slices (A) and homogenates (B). It is also shown the effect of creatine (10 mM) on the activity of different Na^+,K^+-ATPase isoforms (C) and the effect of intracerebroventricular injection of creatine (5 nmol/site) on Na^+,K^+-ATPase activity in rat hippocampus in vivo (D). Data are mean + S.E.M for n=5-10 in each group. *Indicates a significant difference compared with aCSF group.

Figure 2

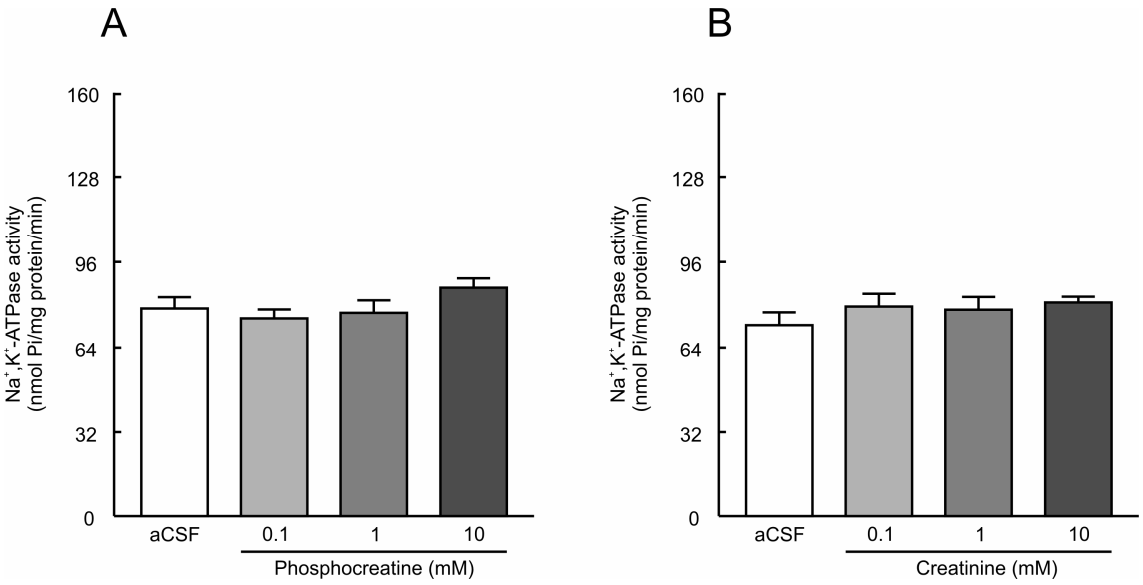


Figure 2: Effect of phosphocreatine (0, 0.1, 1 or 10 mM, A) and creatinine (0, 0.1, 1 or 10 mM, B) on Na^+,K^+-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean + S.E.M for n=6 in each group.

Figure 3

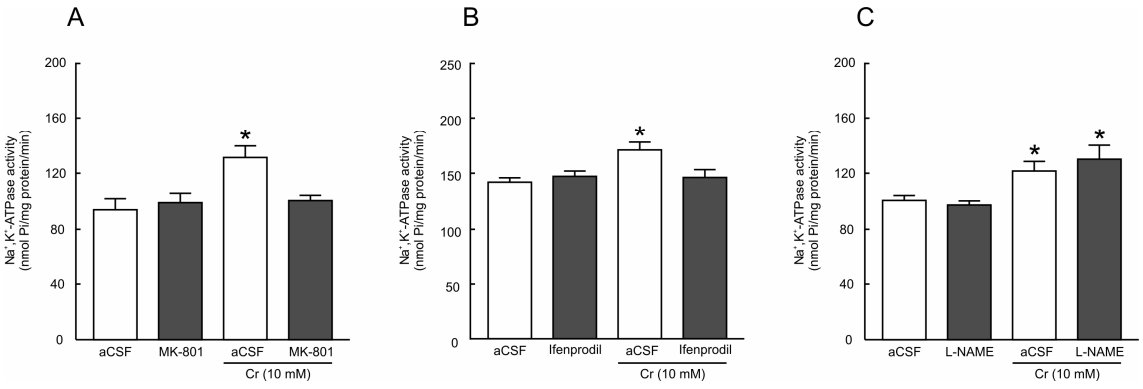


Figure 3: Effect of MK-801 (10 µM, A), ifenprodil (3 µM, B) and L-NAME (100 µM, C) on the creatine-induced (10 mM) increase in Na^+,K^+-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean + S.E.M for n=6-8 in each group. *Indicates a significant difference compared with aCSF group.

Figure 4

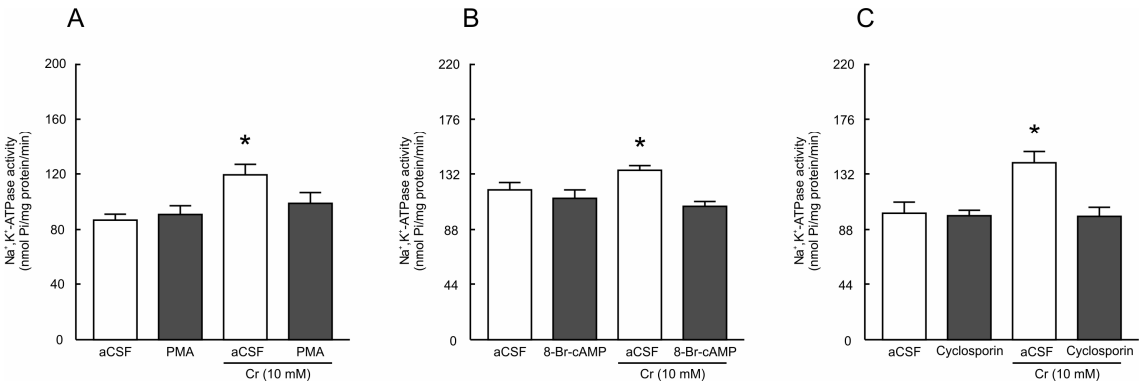


Figure 4: Effect of PMA (100 nM, A), 8-Br-cAMP (30 µM, B) and cyclosporin A (200 nM, C) on the creatine-induced (10 mM) increase in Na^+,K^+-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean + S.E.M for n=6-9 in each group. *Indicates a significant difference compared with all other groups.

CAPÍTULO II

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais e Reagentes

Para realização desta segunda parte do estudo, foram utilizados ratos adultos machos Wistar, pesando entre 250-300g, mantidos sob condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro de 12-12h, 24± ºC, 55% de umidade relativa), com livre acesso à comida (Guabi, Santa Maria, Brasil) e água. O protocolo de utilização animal seguiu as Diretrizes Éticas Oficiais do Governo e do Comitê de Bem-Estar Animal (processo 23081.018516/2006-57). Todos os protocolos experimentais foram desenhados objetivando minimizar o número de animais utilizados, bem como seu sofrimento. Todos os reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

5.2. Administração das drogas e avaliação comportamental

Para avaliar o efeito da administração aguda de creatina nas convulsões induzidas pelo PTZ, primeiramente, os animais foram transferidos para um campo aberto (54,7 cm de diâmetro) e habituados por 20 minutos antes da administração de creatina e PTZ. Após o período de habituação os animais foram injetados com creatina (300 mg/kg, p.o.) ou veículo (0.2 % carbocimetilcelulose, CMC, p.o.) por gavagem intragástrica (administração única), 45 minutos antes da administração de PTZ (30, 45 ou 60 mg/kg, i.p.). Os animais foram observados para a aparição de convulsões clônicas, generalizadas tônico-clônicas e duração dos episódios convulsivos generalizados por 20 minutos após a injeção de PTZ. As doses de creatina e PTZ utilizadas neste estudo foram baseadas em experimentos prévios do nosso grupo (MAGNI et al., 2007; SOUZA et al., 2009; RAMBO et al., 2009).

5.3. Determinação da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase

Imediatamente após o período de avaliação das convulsões os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram o córtex cerebral removido e homogeneizado em 10 volumes de Tris-HCl 30 mM, pH 7.4. A análise da atividade da Na^+-K^+-ATPase foi realizada de acordo com Wyse et al. (2000). O meio de incubação consistiu de: Tampão Tris–HCl 30 mM, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$ e 50 µg de proteína, na presença ou ausência de ouabaína (1mM), em um volume final de 350 µL. A reação foi iniciada pela adição de ATP, em uma concentração final de 5 mM. Após 30 minutos de incubação, a 37 °C, a reação foi terminada pela adição de 70 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Concentrações saturantes de substrato foram usadas e a reação foi linear com a quantidade de proteína e o tempo de incubação. Controles apropriados foram incluídos para a análise da hidrólise não enzimática do ATP. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada foi quantificada pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow (1925), usando KH_2PO_4 como padrão de referência. A atividade enzimática específica foi calculada pela subtração da atividade sensível à ouabaína da atividade total (na ausência de ouabaína) e expressa em nmol de Pi por mg de proteína por minuto.

5.4. Determinação do conteúdo de proteína

O conteúdo de proteína foi medido colorimetricamente pelo método de Bradford (1976) e a albumina sérica bovina (1 mg/mL) utilizada como padrão.

5.5. Procedimento cirúrgico

Para análise eletroencefalográfica das convulsões induzidas por PTZ, bem como de um possível efeito protetor da creatina, um subgrupo de animais sofreu um implante cirúrgico de eletrodos, sob orientação estereotáxica. Resumidamente, os animais foram anestesiados com equitesina (1% fenobarbital, 2% sulfato de magnésio, 4% hidrato de cloral, 42% propilenoglicol, 11% etanol; 3 ml/kg, i.p.) e colocados em um equipamento estereotáxico para roedores. Sob orientação estereotáxica, dois eletrodos de parafuso foram colocados bilateralmente sob o córtex parietal, juntamente com um eletrodo terra de chumbo, fixado sob o sino nasal. As coordenadas a partir do *bregma*, para a implantação dos eletrodos foram (em mm): AP, –4.5; L, 2.5 (PAXINOS & WATSON, 1986). Os eletrodos foram ligados a um conector com múltiplos pinos e então fixados ao crânio do animal com cimento acrílico dentário. Os exames eletroencefalográficos foram feitos 7 dias após a cirurgia.

5.6. Exame e análise eletroencefalográfica

As alterações eletroencefalográficas induzidas pela administração de creatina (300 mg/kg;p.o) e PTZ (30, 45 ou 60 mg/kg, i.p.) foram monitoradas, nos animais, através de registros eletrocorticográficos. Para a realização destas análises, os ratos foram colocados em uma caixa acrílica (25 x 25 x 60) para habituação por pelo menos 20 minutos e então ligados a um conector, dentro de uma gaiola de Faraday. Rotineiramente, 10 minutos de gravação da linha basal foi obtida para estabelecer um período de controle adequado. O efeito da administração oral de creatina sobre a atividade convulsiva induzida por PTZ foi investigado pela administração de creatina (300 mg/kg, p.o.) ou seu veículo (0,2% CMC, p.o.), 45 minutos antes da injeção de PTZ (30, 45 ou 60 mg/kg, i.p.). O comportamento dos animais foi acompanhado e o registro eletroencefalográfico foi concomitantemente gravado, utilizando um

eletroencefalógrafo digital (Neuromap EQSA260, Neurotec LTDA, Brazil). Os sinais eletroencefalográficos foram amplificados, filtrados (passa-bandas 0.1-70 Hz), digitalizados (taxa de amostragem de 256 Hz) e estocados em um computador pessoal para posterior análise *off-line*. Os registros foram analisados visualmente para a aparição de atividade convulsiva. As convulsões foram definidas pela manifestação de episódios que consistiam de alterações nos registros, conforme descrito por McColl et al. (2003). Os dados digitalizados dos períodos basais, administração de creatina ou veículo e período convulsivo foram divididos em segmentos de 30 segundos. Uma amostra de 4 segundos de cada segmento foi utilizada para medir a amplitude das ondas e convertidos pelo método de transformada rápida de Fourier (Fast Fourrier Transformation - FFT) (DRINGENBERG et al., 2003). Os valores do espectro resultante apresentados para cada freqüência foram agrupados em 4 bandas representadas por delta (0–4 Hz), teta (> 4–8 Hz), alfa (> 8–13 Hz) e beta (> 13–30 Hz).

5.7. Análises estatísticas

Os dados comportamentais foram analisados pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon e foram apresentados como medianas e intervalos interquartis. Os dados eletroencefalográficos e a atividade enzimática foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* Student-Newman-Keuls, quando apropriado e foram expressas em média + S.E.M.. Uma probabilidade de $P<0.05$ foi considerada significante e os valores de P, F e U foram mostrados somente se $P<0.05$.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Considerando que existem várias lacunas no entendimento da epilepsia, bem como no efeito agudo da creatina no desenvolvimento e na propagação de eventos convulsivos, o presente estudo teve como objetivo investigar se a administração prévia de creatina (300 mg/kg, p.o.) protege contra as convulsões induzidas pela injeção de PTZ (30, 45 e 60 mg/kg, i.p.).

A Figura 3 demonstra o efeito da administração aguda de creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre as alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas pela injeção de uma dose subconvulsivante de PTZ (30 mg/kg, i.p.). A análise estatística revelou que administração desta dose de PTZ não induziu comportamento convulsivo, caracterizado pela latência para a primeira convulsão clônica (Fig. 3A), generalizada tônico-clônica (Fig. 3B) e a duração dos episódios convulsivos (Fig. 3C), na maioria dos animais. Entretanto, a administração de PTZ (30 mg/kg, i.p.) causou alterações eletroencefalográficas evidenciadas na figuras 3F e 3G. A analise eletroencefalográfica revelou que a presente dose de PTZ aumentou a amplitude dos registros eletroencefalográficos, quando comparado com grupo tratado com CMC (Fig. 3L) e que o tratamento agudo com creatina, que não alterou a amplitude dos períodos basais e pós-tratamento, preveniu completamente o aumento da amplitude induzida por PTZ [$F(2,28)=8.04$; $p<0.05$, Fig. 3L]. O presente efeito também é representado nos registros eletroencefalográficos (Fig. 3G e 3K). Cabe salientar que o tratamento agudo com creatina e PTZ, nesta dose, não alterou os espectros de onda em nenhuma freqüência quando comprado com grupo controle (Fig. 3M).

A Figura 4 demonstra o efeito da administração aguda de creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre as alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas pela injeção de PTZ (45 mg/kg, i.p.). A análise estatística revelou que a administração prévia de creatina não alterou o comportamento convulsivo induzido pela injeção de uma dose intermediaria de PTZ (45 mg/kg, i.p.; Fig. 4 A-C). A analise estatística também revelou que o tratamento agudo com creatina preveniu parcialmente o aumento da amplitude induzida por PTZ

[F(2,20)=36.40; p<0.05, Fig 4L]. O presente efeito também foi observado pelos registros eletroencefalográficos (Fig 4G e 4K). Os valores do espectro de cada onda apresentados na figura 4M revelaram que a administração de PTZ (45 mg/kg, i.p.) e creatina (300 mg/kg, p.o.) não alteraram o padrão das ondas quando comparados com o grupo controle.

O efeito agudo da creatina (300 mg/kg, p.o) sobre as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ (60 mg/kg,i.p) está demonstrada na figura 5. A análise estatística revelou que a administração aguda de creatina aumentou a latência para a primeira convulsão clônica [U=79.5; p<0.05, Fig. 5A], para a convulsão generalizada tônico-clônica [U=68.0; p<0.05, Fig. 5B] e reduziu a duração das convulsões generalizadas tônico-clônicas [U=76.0; p<0.05, Fig. 5C] induzidas por PTZ. A análise estatística também revelou que o tratamento agudo com creatina atenuou o aumento da amplitude induzido por PTZ [F(2,34)=136.39; p<0.05, Fig. 5L], conforme as alterações eletrográficas confirmadas nos registros representativos (Fig 5G e 5K). A análise dos registros eletroencefalográficos também revelou que a administração aguda de creatina reduziu os componentes de onda delta (δ) e aumentou os componentes nas freqüências teta (θ), alfa (α), e beta (β), após a injeção de PTZ (60 mg/kg; i.p.), quando comparado ao grupo tratado com CMC [F(7,72)=14.79; p<0.05, Fig. 5M].

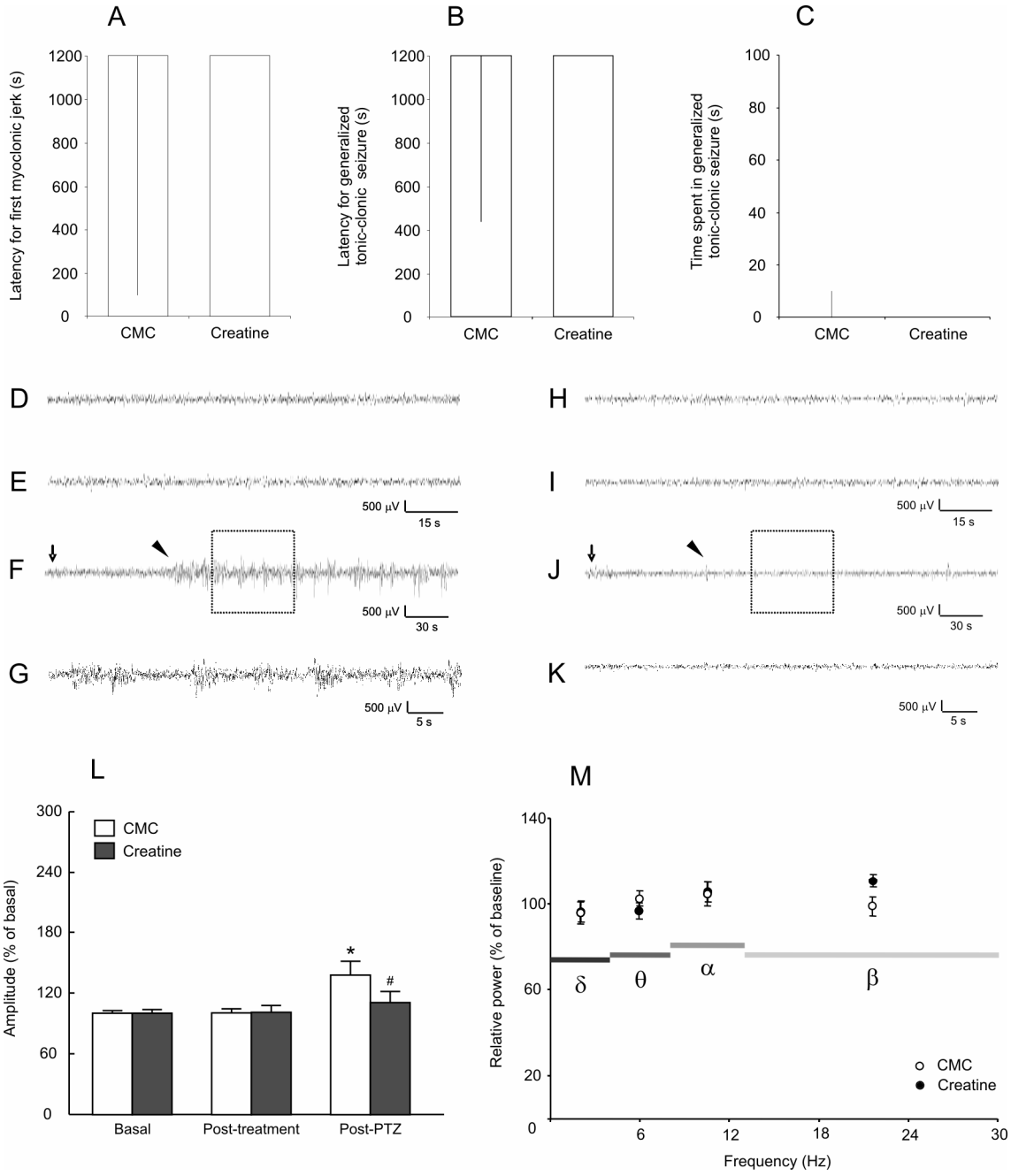
Na medida em que a enzima Na^+,K^+-ATPase é essencial para a manutenção do gradiente eletroquímico celular e modulação dos potenciais de ação e repouso, um prejuízo de sua atividade pode aumentar a excitabilidade neuronal (LI & STYS, 2001). Considerando este fato, o presente trabalho também estudou a relação da atividade desta enzima com o desenvolvimento dos processos convulsivos, induzidos por PTZ, bem como o possível efeito profilático exercido pela administração aguda de creatina.

A análise estatística revelou que a injeção de subconvulsivante de PTZ (30 mg/kg;i.p) induziu uma inibição da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, quando comparado com grupo controle. A análise *post hoc* (Student-Newman-Keuls) revelou que a injeção de doses intermediária e convulsiva de PTZ (45 e 60 mg/kg;i.p) diminuíram a atividade da presente enzima, quando comprado com grupo PTZ (30 mg/kg; i.p). A analise estatística também revelou que a administração prévia de creatina foi efetiva contra a inibição da atividade da

enzima Na^+,K^+-ATPase, induzida pela injeção de PTZ (30-60 mg/kg; i.p.) [$F(7,48)=26.83$; $p<0.05$, Fig 6].

6.1. Legenda das figuras

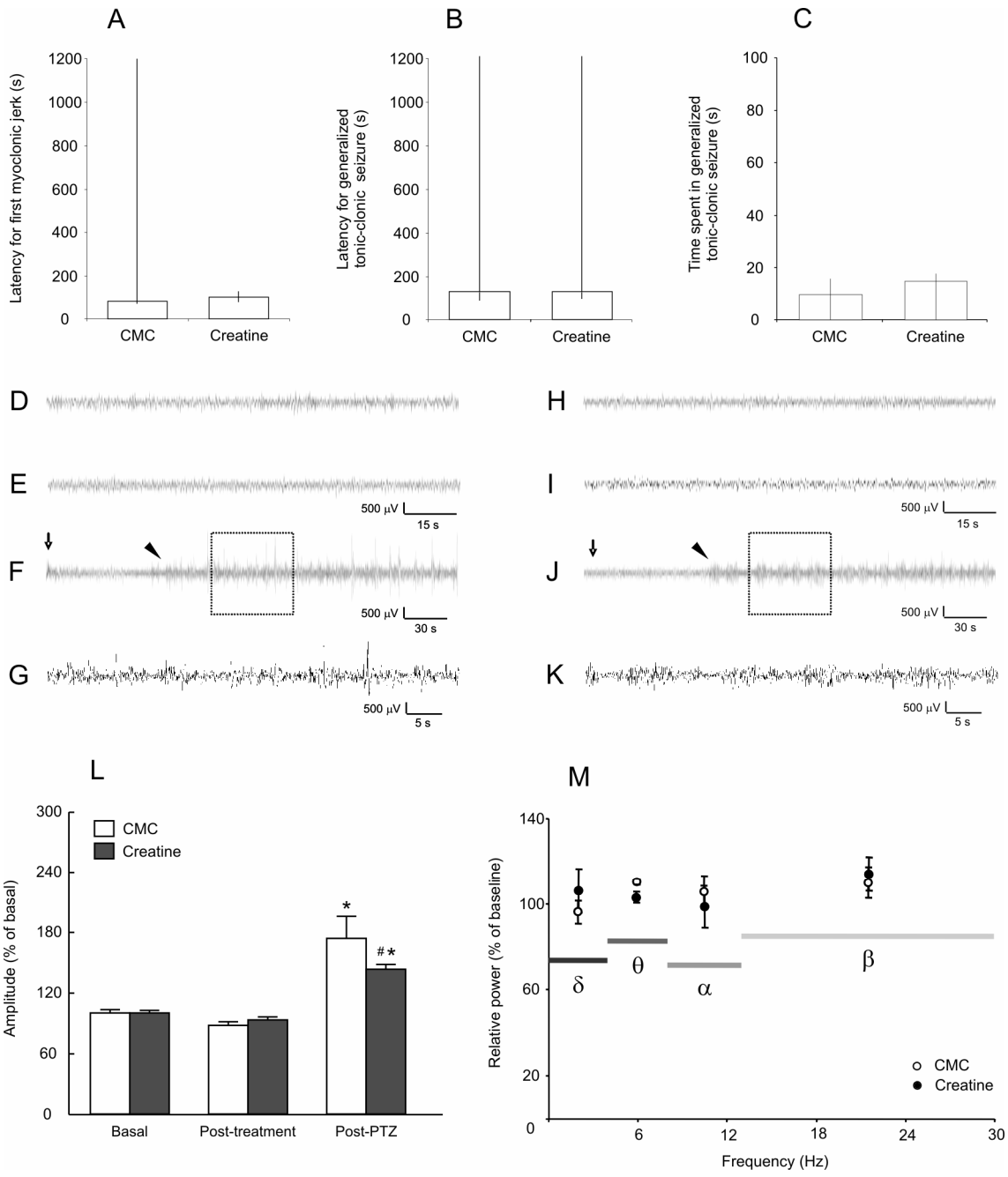
Figura 3



6.1.1. Figura 3

Efeito da creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre o comportamento convulsivo (A, latência para a primeira convulsão clônica; B, latência para a primeira convulsão generalizada tônico-clônica; C, duração da convulsão generalizada tônico-clônica) induzido por PTZ (30 mg/kg, i.p.); D e H representam o registro eletrográfico basal de um animal tratado com CMC ou creatina, respectivamente; E e I, representa um registro eletrográfico após o tratamento de um animal com CMC ou creatina, respectivamente; F e J mostra o registro eletrográfico representativo de um animal tratado com CMC ou creatina, após a injeção de PTZ (30 mg/kg, i.p.); G e K representa o registro eletrográfico ampliado dos períodos selecionados nas caixas em F e J, respectivamente. A quantificação da amplitude das ondas eletrográficas nos diferentes períodos (Basal, Pós tratamento com creatina ou CMC e Pós PTZ) analisados está representada pelo gráfico L; A figura M representa a quantificação dos espectros de ondas nas diferentes freqüências, após a injeção de PTZ (30 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento da injeção de PTZ; As cabeças de seta indicam o momento da primeira manifestação comportamental clônica. Em A, B e C os dados são expressos em medianas e intervalos interquartis, para um n=12 em cada grupo. Em L os dados são expressos em médias + S.E.M. para um n=8 por grupo e * indica diferença significante em comparação a todos os outros grupos; # indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com CMC, no mesmo período. Em M os dados são expressos em médias ± S.E.M. para um n=9 por grupo.

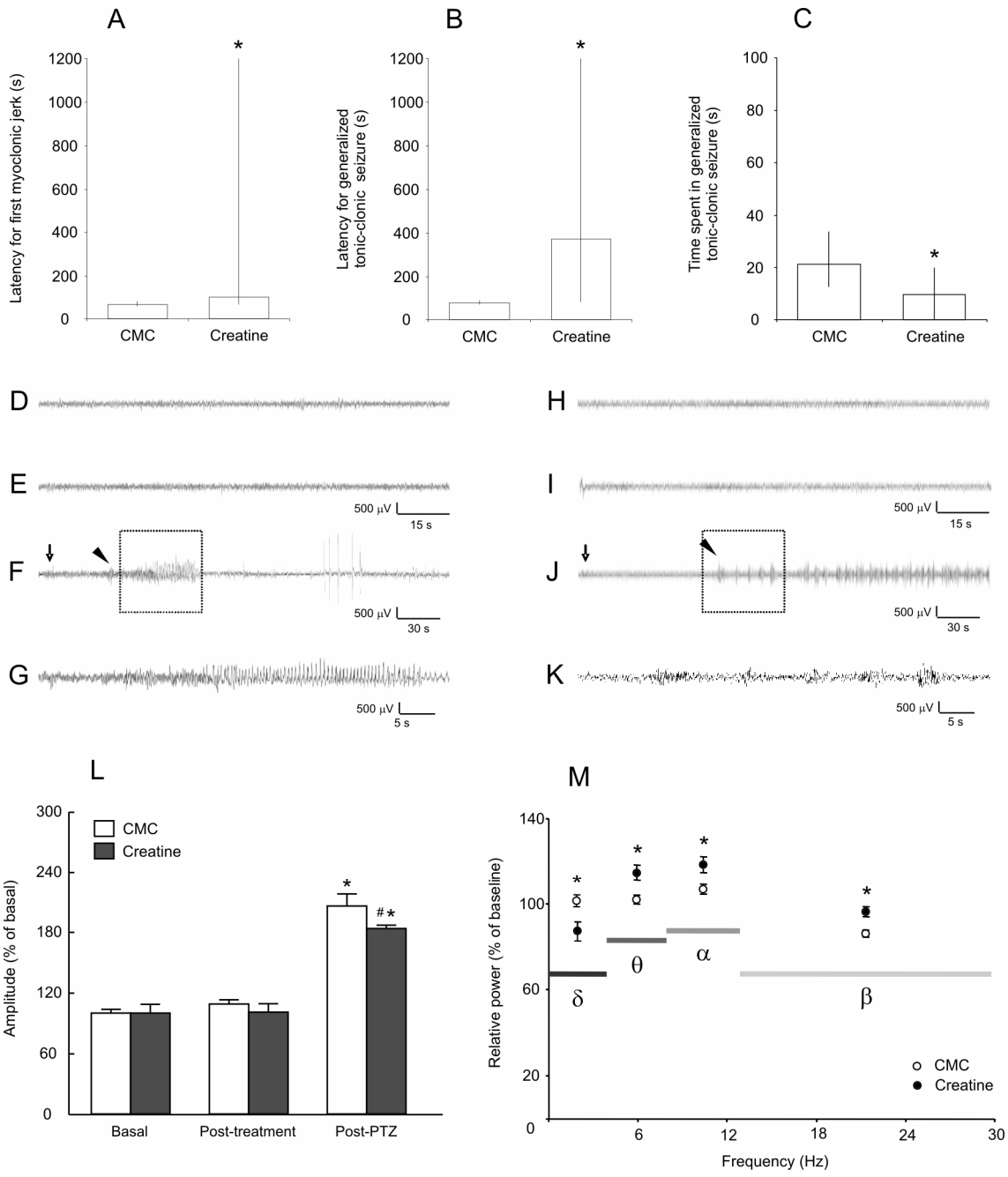
Figura 4


A
B
C
Latency for first myoclonic jerk (s)
Latency for generalized tonic-clonic seizure (s)
Time spent in generalized tonic-clonic seizure (s)
CMC
Creatine
D
E
F
G
H
I
J
K
500 µV
15 s
30 s
5 s
L
M
Amplitude (% of basal)
Basal
Post-treatment
Post-PTZ
Relative power (% of baseline)
Frequency (Hz)
δ
θ
α
β

6.1.2. Figura 4

Efeito da creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre o comportamento convulsivo (A, latência para a primeira convulsão clônica; B, latência para a primeira convulsão generalizada tônico-clônica; C, duração da convulsão generalizada tônico-clônica) induzido por PTZ (45 mg/kg, i.p.); D e H representam o registro eletrográfico basal de um animal tratado com CMC ou creatina, respectivamente; E e I, representa um registro eletrográfico após o tratamento de um animal com CMC ou creatina, respectivamente; F e J mostram o registro eletrográfico representativo de um animal tratado com CMC ou creatina, após a injeção de PTZ (45 mg/kg, i.p.); G e K representa o registro eletrográfico ampliado dos períodos selecionados nas caixas em F e J, respectivamente. A quantificação da amplitude das ondas eletrográficas nos diferentes períodos (Basal, Pós tratamento com creatina ou CMC e Pós PTZ) analisados está representada pelo gráfico L; A figura M representa a quantificação dos espectros de ondas nas diferentes freqüências, após a injeção de PTZ (45 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento da injeção de PTZ; As cabeças de seta indicam o momento da primeira manifestação comportamental clônica. Em A, B e C os dados são expressos em medianas e intervalos interquartis, para um n=15-17 em cada grupo. Em L os dados são expressos em médias + S.E.M. para um n=6 por grupo e * indica diferença significante em comparação a todos os outros grupos; # indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com CMC, no mesmo período. Em M os dados são expressos em médias ± S.E.M. para um n=6 por grupo.

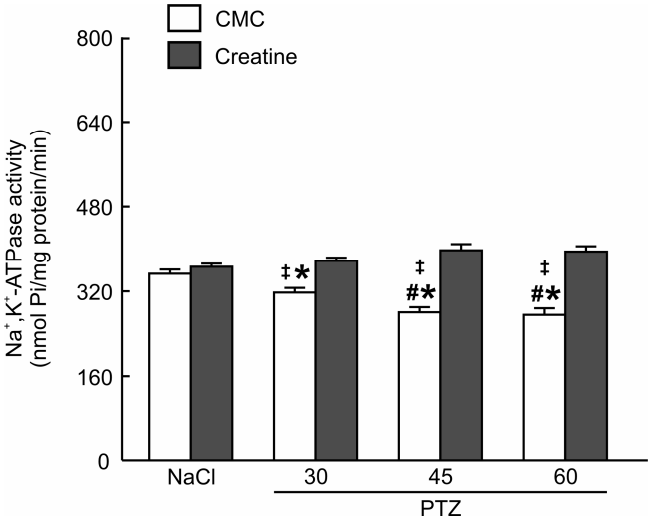
Figura 5


A
B
C
Latency for first myoclonic jerk (s)
Latency for generalized tonic-clonic seizure (s)
Time spent in generalized tonic-clonic seizure (s)
CMC
Creatine
D
E
F
G
H
I
J
K
500 µV
15 s
30 s
5 s
L
M
Amplitude (% of basal)
Basal
Post-treatment
Post-PTZ
Relative power (% of baseline)
Frequency (Hz)
δ
θ
α
β

6.1.3. Figura 5

Efeito da creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre o comportamento convulsivo (A, latência para a primeira convulsão clônica; B, latência para a primeira convulsão generalizada tônico-clônica; C, duração da convulsão generalizada tônico-clônica) induzido por PTZ (60 mg/kg, i.p.); D e H representam o registro eletrográfico basal de um animal tratado com CMC ou creatina, respectivamente; E e I, representa um registro eletrográfico após o tratamento de um animal com CMC ou creatina, respectivamente; F e J mostram o registro eletrográfico representativo de um animal tratado com CMC ou creatina, após a injeção de PTZ (60 mg/kg, i.p.); G e K representa o registro eletrográfico ampliado dos períodos selecionados nas caixas em F e J, respectivamente. A quantificação da amplitude das ondas eletrográficas nos diferentes períodos (Basal, Pós tratamento com creatina ou CMC e Pós PTZ) analisados está representada pelo gráfico L; A figura M representa a quantificação dos espectros de ondas nas diferentes freqüências, após a injeção de PTZ (60 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento da injeção de PTZ; As cabeças de seta indicam o momento da primeira manifestação comportamental clônica. Em A, B e C os dados são expressos em medianas e intervalos interquartis, para um n=16-17 em cada grupo. Em L os dados são expressos em médias + S.E.M. para um n=9-10 por grupo e * indica diferença significante em comparação a todos os outros grupos; # indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com CMC, no mesmo período. Em M os dados são expressos em médias ± S.E.M. para um n=10 por grupo e * indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com CMC, na mesma freqüência de onda.

Figura 6



6.1.4. Figura 6

Efeito da administração aguda de creatina (300 mg/kg, p.o.) sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase do córtex cerebral de ratos após a injeção de PTZ (30, 45 ou 60 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos em médias + S.E.M. para um n=7 por grupo. * indica diferença significante em comparação ao grupo CMC-NaCl; ‡ indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com creatina, na respectiva dose de PTZ; # indica diferença significante em comparação ao grupo tratado com CMC-PTZ30;

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a incubação com creatina aumenta a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase em fatias hipocampais de ratos, efeito este, específico para as isoformas $\alpha_{2/3}$ da enzima. Entretanto, o efeito estimulatório deste composto guanidínico sobre a atividade da presente enzima não foi observado em homogeneizado hipocampal, sugerindo que seja necessário um sistema celular intacto para que ocorra o referido efeito, ou seja, um sistema no qual as vias de sinalização intracelulares não tenham sido rompidas pela homogeneização do tecido. De acordo com essa hipótese, a injeção i.c.v. de creatina aumentou a atividade da Na^+,K^+-ATPase *ex vivo*. Por outro lado, também é possível que a homogeneização do tecido tenha rompido ligações importantes entre proteínas ancoradouras, receptores NMDA, quinases e a enzima Na^+,K^+-ATPase, resultando em desacoplamento dos componentes modulatórios da enzima.

Os resultados obtidos no presente estudo também demonstraram que a incubação das fatias hipocampais com MK-801 (antagonista não competitivo dos receptores NMDA), ifenprodil (antagonista dos receptores NMDA que contém a subunidade NR2B) e ciclosporina A (inibidor da calcineurina) atenuaram os efeitos estimulatórios da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase. Cabe salientar que incubação das fatias hipocampais com a forma fosforilada (fosfocreatina) ou seu metabólito (creatinina) não alteraram a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, sugerindo que o aumento na atividade da Na^+,K^+-ATPase induzido por creatina seja independe de alterações no *status* bioenergético do hipocampo. Já, a incubação com ativadores da PKA (8-Br-AMPc) e da PKC (PMA) atenuaram o aumento da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, induzido por creatina.

Na literatura, diversos estudos têm demonstrado que os benefícios da creatina vão além da melhora do desempenho obtidos pelos atletas, na medida em que a suplementação deste composto guanidinico também exerce um efeito neuroprotetor em diversos modelos experimentais de doenças neurológicas (HOLTZMAN et al., 1998a; KLIVENYI et al., 1999; WICK et al.,

1999; MALCON et al., 2000; ROYES et al., 2003; MAGNI et al., 2007). Além disso, alguns estudos têm sugerido o envolvimento da creatina em processos fisiológicos importantes como o aprendizado e a memória (WATANABE et al. 2002; RAE et al., 2003; VALENZUELA et al. 2003; McMORRIS et al., 2007a; 2007b).

Apesar de seu efeito como tampão energético ter sido o principal mecanismo utilizado para explicar os efeitos exercidos pela creatina no SNC (ROYES et al., 2003, 2006, SAKELLARIS et al., 2006, KLEIN & FERRANTE, 2007, MAGNI et al., 2007, ADHIHETTY & BEAL, 2008), um crescente número de estudos tem evidenciado efeitos não relacionados ao metabolismo energético para a creatina. Neste contexto, Prass e co-autores (2007) mostraram que a creatina previne contra a redução do fluxo sanguíneo cerebral, após isquemia, independentemente de alterações no *status* bioenergético do tecido celular. A creatina também reduz as respostas inibitórias do GABA e da glicina, em culturas celulares de neurônios de camundongos (DE DEYN & MACDONALD, 1990) e não é somente sintetizada pelos neurônios centrais, mas também liberada de maneira dependente de potencial de ação (exocitose) (ALMEIDA et al., 2006).

Recentes achados eletrofisiológicos do nosso grupo tem evidenciado que a creatina aumenta a amplitude e o número de espículas em fatias hipocampais e que este efeito é revertido por AP5, um antagonista dos receptores NMDA (ROYES et al., 2008). Além disso, Oliveira e colaboradores (2008) verificaram que a administração intrahipocampal de creatina resulta em melhora no aprendizado espacial, provavelmente por modular o sítio das poliaminas no receptor NMDA, sugerindo o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito induzido pela creatina (ROYES et al., 2008). Nesse contexto, os resultados apresentados neste estudo corroboram com a ideia de que a creatina exerce um efeito neuromodulador (ALMEIDA et al., 2006) e sugerem que efeito estimulatório exercido sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase é dependente da ativação de receptores NMDA-NR2B.

Considerando que o efeito exercido pela creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase seja dependente da ativação de receptores NMDA-NR2B e que a via glutamato-NMDA-NOS estimula a atividade da Na^+,K^+-ATPase $\alpha_{2/3}$ (MUNHOZ et al., 2005), decidimos investigar se o efeito da

creatina sobre a Na^+,K^+-ATPase envolve a enzima NOS. A análise estatística revelou que incubação de fatias de hipocampo com L-NAME, um inibidor não específico da enzima oxido nítrico sintase, não bloqueou o efeito estimulatório exercido pela creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, sugerindo que outra via intracelular ativada por receptores NMDA pode ser a responsável por tal efeito.

Nas células gliais e neuronais, respectivamente, as isoformas α_2 e α_3 da enzima Na^+,K^+-ATPase são responsáveis pela manutenção da excitabilidade neuronal, na medida em que controlam o potencial de membrana e a recaptação de K^+ após a despolarização (LECUONA et al., 1996, PENG et al., 1997, MOBASHERI et al., 2000). Consequentemente, uma alteração conformacional e/ou funcional em alguma das isoformas da enzima pode alterar a atividade da mesma e afetar a atividade neuronal, bem como a sinalização celular (MOSELEY et al., 2007). Cabe salientar que um prejuízo no funcionamento da Na^+,K^+-ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR et al., 1992). De fato, diversos estudos têm evidenciado que o inibidor da Na^+,K^+-ATPase, ouabaína, aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (FUJISAWA et al., 1965), causa convulsões em camundongos (JAMME et al., 1995), induz a uma liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (LI & STYS, 2001) e leva a morte celular no hipocampo de ratos (LEES et al., 1990). Uma supressão genética da Na^+,K^+-ATPase também causa prejuízo ao aprendizado espacial e leva ao aparecimento de um comportamento típico de ansiedade em camundongos (MOSELEY et al., 2007).

No intuito de verificar o envolvimento das isoformas α da enzima Na^+,K^+-ATPase sobre o efeito exercido pela creatina, foi utilizada uma técnica farmacológica clássica, baseada na sensibilidade de cada isoforma da enzima à ouabaína (NISHI et al., 1999a). Os resultados obtidos no presente estudo indicaram a participação das isoformas $\alpha_{2/3}$ no aumento da atividade da Na^+,K^+-ATPase.

Dentre as diversas vias intracelulares que regulam a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, pode-se destacar a enzima calcineurina, uma proteína citoplasmática presente em diversas células, incluindo linfócitos e células

dendríticas (MALLINSON et al., 2009). Estudos em células do túbulo renal (APERIA et al., 1992) e do córtex cerebral de ratos (MALLICK et al., 2000) têm evidenciado que uma ativação da enzima calcineurina causada pela estimulação de receptores α-adrenérgicos desfosforila a enzima Na^+,K^+-ATPase, ativando-a. Cabe salientar que uma estimulação de receptores NMDA ativa a calcineurina em diferentes estruturas cerebrais, incluindo fatias do estriado e do hipocampo de ratos (HALPAIN et al., 1990, HALPAIN & GREENGARD, 1990). Além disso, a ativação de NMDA e, subseqüente, calcineurina, por glutamato, em cultura de neurônios cerebelares, estimula a Na^+,K^+-ATPase (MARCAIDA et al., 1996). No presente estudo, foi demonstrado que o aumento na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase induzido por creatina, foi atenuado pela incubação com ciclosporina A, um inibidor da calcineurina. Além disso, a incubação das fatias hipocampais com os ativadores da PKC (PMA) ou PKA (8-Br-AMPc), atenuaram o efeito da creatina sobre a atividade da Na^+,K^+-ATPase, indicando que tanto a PKA quanto a PKC também estão envolvidas no efeito exercido pela creatina na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase. Desta forma, é plausível propor que a estimulação da Na^+,K^+-ATPase, exercida pela creatina, via calcineurina, pode ocorrer de duas maneiras: diretamente, por contrabalançar a fosforilação mediada pela PKC, na enzima Na^+,K^+-ATPase, através da desfosforilação do resíduo de serina 23 na subunidade α (BERTUCCIO et al., 2003; 2007) ou indiretamente, por desfosforilar o sítio de fosforilação para a PKA na fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina (DARPP-32) (NISHI et al., 1999b). Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para complementar esses resultados.

Em resumo, no capítulo I deste estudo nós mostramos que a incubação de fatias de hipocampo de ratos, com creatina, aumenta a atividade da Na^+,K^+-ATPase $\alpha_{2/3}$ e, que a injeção i.c.v. deste composto, também aumenta a atividade da Na^+,K^+-ATPase *ex vivo*. Mesmo sabendo que a creatina tem um conhecido papel como tampão energético (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000), os resultados deste primeiro capítulo sugerem que o mecanismo envolvido no efeito da creatina sobre a atividade da Na^+,K^+-ATPase envolve a participação dos receptores NDMA/NR2B e conseqüente ativação da enzima calcineurina. Cabe salientar que a ativação desta fosfatase contrabalança as fosforilações induzidas por PKA e PKC e induz a uma ativação das isoformas $\alpha_{2/3}$ da enzima Na^+,K^+-ATPase. Estes mecanismos podem, pelo menos em

parte, serem responsáveis pelo papel protetor deste composto diante de certas doenças neurológicas, onde a atividade da Na^+,K^+-ATPase se encontra inibida, como na epilepsia (GRISAR et al., 1992; JURKAT-ROTT et al., 2004).

Neste sentido, visto que as convulsões induzidas pelo agente convulsivante (PTZ) não alteram o *status* bioenergético celular (HOLTZMAN et al., 1998b; BONAN et al., 2000) e inibem a atividade da Na^+,K^+-ATPase (RAMBO et al., 2009), e que a creatina modula a atividade desta enzima, por um mecanismo independente do metabolismo energético, decidimos verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre as convulsões induzidas por PTZ. Os resultados do segundo capítulo demonstraram que o tratamento agudo com creatina (300 mg/kg) atenuou as alterações eletrográficas induzidas pela injeção de doses subconvulsivantes de PTZ (30 e 45 mg/kg, i.p) e preveniu o aparecimento das convulsões clônicas e generalizadas tônico-clônicas, induzidas pela injeção de dose convulsivante de PTZ (60 mg/kg,i.p). Cabe salientar que a administração de PTZ (30 mg/g, i.p), apesar de não ter provocado manifestações comportamentais, aumentou a amplitude do registro eletrocorticográfico e inibiu a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase. Por outro lado, o tratamento com creatina preveniu completamente as alterações eletrográficas e a inibição da atividade da Na^+,K^+-ATPase, sugerindo que creatina pode estar influenciando na gênese das convulsões induzidas por este agente convulsivante, possivelmente por aumentar o limiar para as convulsões e modular a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase.

Dada a importância da Na^+,K^+-ATPase no cérebro, certas alterações na sua atividade podem influenciar a excitabilidade neuronal (MOSELEY et al., 2007). Neste contexto, tem sido demonstrado que o inibidor da Na^+,K^+-ATPase, ouabaína, causa convulsões em camundongos (JAMME et al., 1995), indicando que, de fato, déficits na atividade desta enzima podem estar intimamente relacionados com o aparecimento de convulsões. Recentes estudos têm demonstrado que o grau de inibição da Na^+,K^+-ATPase induzido pela injeção intraperitoneal de PTZ, se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por este agente (FIGHERA et al., 2006; SOUZA et al., 2009). Estes achados experimentais reforçam a ideia de que a manutenção da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase é crucial para a homeostase neuronal e que pequenas alterações podem ser responsáveis por

desencadear processos patológicos, como a epilepsia. Além disso, a efetiva proteção exercida pela administração aguda de creatina sugere que o mecanismo envolvido nesta proteção contra as convulsões se deva pela manutenção da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase.

Constatamos também, que apenas a dose de 60 mg/kg de PTZ alterou o espectro de ondas do período convulsivo. Esta variação na atividade das freqüências no espectro esta associado com certas manifestações comportamentais, como o rastejamento, o *freezing*, a postura tônica dos membros ou ainda hiperatividade (THARP, 2002; PATRIZI et al., 2003). Além disso, os resultados mostraram que os animais tratados com creatina tiveram menor atividade oscilatória na freqüência delta (0.1-4 Hz) e maior oscilação nas freqüências teta (4-7 Hz), alfa (7-12) e beta (12-30 Hz), quando comparados aos animais tratados com CMC. Cabe salientar que a variação de freqüência no espectro pode ter relação com a atividade convulsiva, induzida pela injeção de uma dose convulsiva de PTZ (60 mg/Kg; i.p), e que a diferença evidenciada entre os grupos seja conseqüência das convulsões menos intensas induzidas pelo tratamento prévio com creatina.

Em resumo, os resultados aqui apresentados fornecem evidências convincentes de que, em situações fisiológicas, a creatina estimula a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase por ativação de receptores do subtipo NMDA, contendo a subunidade NR2B. Além disso, uma subseqüente desfosforilação da enzima Na^+,K^+-ATPase, induzida pela ativação de calcineurina, em fatias de hipocampo de ratos, após a incubação com creatina, reforça a hipótese neuromodulatória exercida por este composto guanidínico nos processos de transmissão no sistema nervoso central (SNC). No presente estudo, também foi evidenciado que a administração aguda de creatina protege contra as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por diferentes doses de PTZ. Estes resultados sugerem que parte dos efeitos protetores exercido pela creatina, neste modelo de convulsão, se deva pela modulação na atividade de enzimas chave para o funcionamento neuronal, como a enzima Na^+,K^+-ATPase. Embora estudos adicionais devam ser realizados para complementar esses achados, o papel da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase pode ser de grande valia para o entendimento deste composto

guanidínico no SNC, bem como estabelecer novas condutas para o tratamento de doenças neurológicas, como a epilepsia.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, pode-se concluir:

8.1. Capítulo I

1. A creatina aumenta a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase *in vitro e ex vivo*, em ratos, por mecanismos independentes do metabolismo energético, uma vez que os tratamentos com fosfocreatina e creatinina não alteraram a atividade da mesma.

2. O aumento na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase em fatiais de hipocampo de ratos parece depender da ativação de receptores NMDA, contendo a sub-unidade NR2B e, subseqüente, estimulação da proteína fosfatase 2B (calcineurina).

3. O efeito da creatina sobre a atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase parece ser específicos para as subunidades $\alpha_{2/3}$.

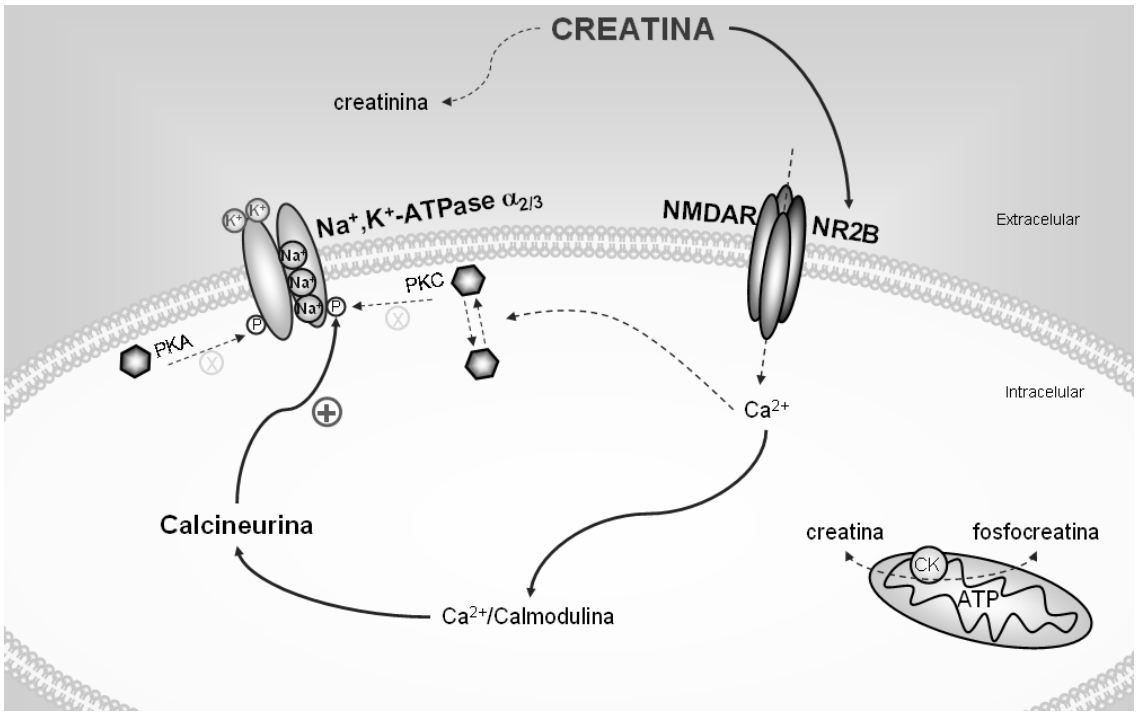


Figura 7: Representação esquemática das conclusões do capítulo I (artigo científico).

8.2. Capítulo II

1. Alterações na atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase parecem influenciar na excitabilidade neuronal, bem como no aparecimento de convulsões, induzidas por PTZ.

2. A manutenção da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase, induzida pela administração aguda de creatina, previne do aparecimento, bem como do desenvolvimento de convulsões, induzidas por PTZ.

9. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

ADHIHETTY, P.J.; BEAL, M.F.. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. **Neuromolecular Medicine**, v. 10, p. 275-290, 2008.

ALFIERI, R.R.; BONELLI, M.A.; CAVAZZONI, A.; BRIGOTTI, M.; FUMAROLA, C.; SESTILI, P.; MOZZONI, P.; DE PALMA, G.; MUTTI, A.; CARNICELLI, D.; VACONDIO, F.; SILVA, C.; BORGHETTI, A.F.; WHEELER, K.P.; PETRONINI, P.G.. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. **Journal of Phisiology**, v. 576, p. 391-401, 2006.

ALMEIDA, L.S.; SALOMONS, G.S.; HOGENBOOM, F.; JAKOBS, C.; SCHOFFELMEER, A.N.. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse**, v. 60 p. 118-23, 2006.

ANDRES, R.H.; DUCRAYA, A.D.; SCHLATTNERB, U.; WALLIMANN, T.; WIDMER, H.R.. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 329-343, 2008.

APERIA, A.; IBARRA, F.; SVENSSON, L.B.; KLEE, C.; GREENGARD, P.. Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na+,K(+)-ATPase activity in renal tubule cells. **Proceedings of National Academy Science United States of America**, v. 89, p; 7394-7397, 1992.

BENDER, A.; KOCH, W.; ELSTNER, M.; SCHOMBACHER, Y.; BENDER, J.; MOESCHL, M.; GEKELER, F.; MÜLLER-MYHSOK, B.; GASSER, T.; TATSCH, K.; KLOPSTOCK, T.. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. **Neurology**, v. 67, p. 1262-1264, 2006.

BENDER, A.; SAMTLEBEN, W.; ELSTNER, M.; KLOPSTOCK, T.. Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with Parkinson disease. **Nutrition Research**, v. 28, p. 172-178, 2008.

BERTORELLO, A.M.; APERIA, A.; WALAAS, S.I.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na+,K(+)-ATPase inhibits the activity of the enzyme. **Proceedings of National Academy Science United States of America**, v. 88, p.11359-11362, 1991.

BERTUCCIO, C.A.; ARRIZURIETA, E.E.; IBARRA, F.R.; MARTÍN, R.S.. Mechanisms of PKC-dependent Na+ K+ ATPase phosphorylation in the rat kidney with chronic renal failure. **Renal Failure**, v. 29, p. 13-22, 2007.

BERTUCCIO, C.A.; CHENG, S.X.; ARRIZURIETA, E.E.; MARTÍN, R.S.; IBARRA, F.R.. Mechanisms of Na+-K+-ATPase phosphorylation by PKC in the medullary thick ascending limb of Henle in the rat. Pflugers Archiv: **European Journal of Physiology**, v. 447, p. 87-96, 2003.

BLANCO, G.; MERCER, R.W.. Regulation of the alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 isozymes of the Na,K-ATPase by Ca2+, PKA, and PKC. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, p. 572-575, 1997.

BLUME, W.T.. Epilepsy: advances in management. **European Neurology**, v. 38, p. 198-208, 1997.

BONAN, C.D.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochemistry Research**, v. 25, p. 775-779, 2000.

BOTHWELL, J.H.; RAE, C.; DIXON, R.M.; STYLES, P.; BHAKOO, K.K.. Hypo-osmotic swelling-activated release of organic osmolytes in brain slices: implications for brain oedema in vivo. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, p. 1632-1640, 2001.

BOTHWELL, J.H.; STYLES, P.; BHAKOO, K.K.. Swelling-activated taurine and creatine effluxes from rat cortical astrocytes are pharmacologically distinct. **The Journal of Membrane Biology**, v. 185, p. 157-164, 2002.

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Bioquemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAISSANT, O.; HENRY, H.; LOUP, M.; EILERS, B.; BACHMANN, C.. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Research. Molecular Brain Research**. v. 86, p. 193–201, 2001.

BÜRKLEN, T.S.; SCHLATTNER, U.; HOMAYOUNI, R.; GOUGH, K.; RAK, M.; SZEGHALMI, A.; WALLIMANN, T.. The Creatine Kinase/Creatine Connection to

Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2006(3), p. 35936, 2006.

CARPIO, A.; HAUSER, W.A.. Epilepsy in the developing world. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 9, p. 319-326, 2009.

CAVALHEIRO, E.A.. A epilepsia. **Ciência Hoje**, v. 8, n. 45, 1988.

CHENG, S.X.; AIZMAN, O.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; APERIA, A.. [Ca2+]i determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na+,K+-ATPase. **The Journal of Physiology**, v. 518, p. 37-46, 1999.

CHENG, X.J.; FISONE, G.; AIZMAN, O.; AIZMAN, R.; LEVENSON, R.; GREENGARD, P.; APERIA A.. PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. **The American Journal of Physiology**, v. 273, p. 893-901, 1997b.

CHENG, X.J.; HÖÖG, J.O.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; APERIA, A.. Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. **The American Journal of Physiology**, v. 273, p.1981-1986, 1997a.

CHEVREUL, M.E.. Sur la composition chimique du bouillon de viandes. **Journal de Pharmacie Science Access**, v. 21, p. 231-242, 1835.

CHRISTIE, D.L.. Functional insights into the creatine transporter. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 46, p. 99-118, 2007.

CLAUSEN, T.. Clinical and therapeutic significance of the Na+,K+ pump. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 95, p. 3-17, 1998.

CLAUSEN, T.; VAN HARDEVELD, C.; EVERTS, M.E.. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 733-774, 1991.

DE, DEYN, P.P.; MACDONALD, R.L.. Guanidino compounds that are increased in cerebrospinal fluid and brain of uremic patients inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. **Annals of Neurology**, v. 28, p. 627-633, 1990.

DOLDER, M.; WALZEL, B.; SPEER, O.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T.. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 17760-17766, 2003.

DRINGENBERG, H.C.; VANDERWOLF, C.H.; NOSEWORTHY, P.A.. Superior colliculus stimulation enhances neocortical serotonin release and electrocorticographic activation in the urethane-anesthetized rat. **Brain Research**, v. 964, p. 31-41, 2003.

DUDEK, F.E.; OBENAUS, A.; SCHWEITZER, J.S.; WARIN, J.P.. Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells with mossy fiber sprouting. **Hippocampus**, v. 4, p. 259-265, 1994.

ELLIS, A.C.; ROSENFELD, J.. The role of creatine in the management of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. **CNS Drugs**, v. 18, p. 967-980, 2004.

ENGEL, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 141-150, 1996.

FERRANTE, R.F; ANDREASSEN, O.A.; JENKINS, B.G.; DEDEOGLU, A.; KUEMMERLE, S.; KUBILUS, J.K.; KADDURAH-DAOUK, R.; HERSCH S.M.; BEAL, M.F.. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease, **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 4389–4397, 2000.

FIGHERA, M.R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; BRAUER, M.C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, L.L.; FRUSSA-FILHO, R.; WAJNER, M.; DE MELLO, C.F.. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport**, v. 10, p. 2039-2043, 1999.

FIGHERA, M.R.; ROYES, L.F.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FRUSSA-FILHO, R.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F.. GM1 ganglioside prevents seizures, Na+,K+-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. **Neurobiology of Disease**, v. 22, p. 611-623, 2006.

FISHER, R.S.; VAN EM DE BOAS, W.; BLUME, W.; ELEGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. J.. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the ILAE and the Internatinal Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, p. 470-472, 2005.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y.J.. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y.J.. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. **Science**, v. 65, p. 401-403, 1927.

FISONE, G.; CHENG, S.X.; NAIRN, A.C.; CZERNIK, A.J.; HEMMINGS, H.C.; JR.; HÖÖG, J.O.; BERTORELLO, A.M.; KAISER, R.; BERGMAN, T.; JÖRNVALL, H.. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na+,K(+)-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9368-9373, 1994.

FONG, G.C.; FONG, J.K.. Recent advances in the diagnosis and management of epilepsy. **Hong Kong Medical Journal**, v. 7, p. 73-84, 2001.

FONS, C.; SEMPERE, A.; ARIAS, A.; LÓPEZ-SALA, A.; PÓO, P.; PINEDA, M.; MAS, A.; VILASECA, M.A.; SALOMONS, G.S.; RIBES, A.; ARTUCH, R.; CAMPISTOL, J.. Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 31, p. 724-728, 2008.

FONS, C.; SEMPERE, A.; SANMARTÍ, F.X.; ARIAS, A.; PÓO, P.; PINEDA, M.; RIBES, A.; MERINERO, B.; VILASECA, M.A.; SALOMONS, G.S.; ARTUCH, R.; CAMPISTOL, J.. Epilepsy spectrum in cerebral creatine transporter deficiency. **Epilepsia**, v. 50, p. 2168-2170, 2009.

FUJISAWA, H.; KAJIKAWA, K.; OHI, Y.; HASHIMOTO, Y.; YOSHIDA, H.. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 15, p. 327-334, 1965.

FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, A.P.; FIORENZA, N.G.; DE CARVALHO-MYSKIW, J.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochemistry International**, v. 50, p. 164-171, 2007.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE. A.. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 6-15, 1997.

GREENHAFF, P.L.. Creatine supplementation: recent developments. **British Journal of Sports and Medicine**, v. 30, p. 276-277, 1996.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, AV.. Contribution of Na+,K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Research**, v. 12, p. 141-149, 1992.

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I.. Considerações gerais em epilepsia. **Lemos Editorial**, São Paulo-SP, p. 1-10, 2000.

HALPAIN, S.; GIRAULT J.A.; GREENGARD, P.. Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. **Nature**, 1990 v. 25, p. 369-372, 1990.

HALPAIN, S.; GREENGARD, P.. Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. **Neuron**, 1990 v. 5, p. 237-246, 1990.

HAUSER, W.A.; ANNEGERS, J.F.; ROCCA, W.A.. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 71, p. 578-586, 1996.

HAUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W.. Regulation of cell function by the cellular hydration state. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 343–355, 1994.

HERSCH, S.M.; GEVORKIAN, S.; MARDER, K.; MOSKOWITZ, C.; FEIGIN, A.; COX, M.; COMO, P.; ZIMMERMAN, C.; LIN, M.; ZHANG, L.; ULUG, A.M.; BEAL, M.F.; MATSON, W.; BOGDANOV, M.; EBBEL, E.; ZALETA, A.; KANEKO, Y.; JENKINS, B.; HEVELONE, N.; ZHANG, H.; YU, H.; SCHOENFELD, D.; FERRANTE, R.; ROSAS, H.D.. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. **Neurology**, v. 66, p. 250-252, 2006.

HOLTZMAN, D.; MULKERN, R.; MEYERS, R.; COOK, C.; ALLRED, E.; KHAIT, I.; JENSEN, F.; TSUJI, M.; LAUSSEN, P.. In vivo phosphocreatine and ATP in piglet cerebral gray and white matter during seizures. **Brain Research**, v. 783, p. 19-27, 1998b.

HOLTZMAN, D.; TOGLIATTI, A.; KHAIT, I.; JENSEN, F.. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. **Pediatric Research**, v. 44, p. 410-414, 1998a.

HORISBERGER, J.D.. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology (Bethesda)**, v. 19, p. 377-387, 2004.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v. 30, p. 389-399, 1989.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 22, p. 489-501, 1981.

JAMME, I.; PETIT, E.; DIVOUX, D.; GERBI, A.; MAIXENT, J.M.; NOUVELOT, A.. Modulation of mouse cerebral Na+,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 29, p. 333-337, 1995.

JORGENSEN, P.L.; HAKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J.. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology,** v. 65, p. 817-849, 2003.

JURKAT-ROTT, K.; FREILINGER, T.; DREIER, J.P.; HERZOG, J.; GÖBEL, H.; PETZOLD, G.C.; MONTAGNA, P.; GASSER, T.; LEHMANN-HORN, F.; DICHGANS, M.. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na+/K+-ATPase variants. **Neurology**, v. 25, p. 1857-1861, 2004.

KAPLAN, J.H.; Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 511-535, 2002.

KLEIN, A.M.; FERRANTE, R.J.. The neuroprotective role of creatine. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 46, p. 205-243, 2007.

KLIVENYI, P.; FERRANTE, R.J; MATTHEWS, R.T.; BOGDANOV, M.B.; KLEIN, A.M.; ANDREASSEN, O.E.; MUELLER, G.; KADDURAH-DAOUK, R.; BEAL, M.F.. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Medicine**, v. 44, p. 761-767, 1999.

KLIVENYI, P.; KIAEI, M.; GARDIAN, G.; CALINGASAN, N.Y.; BEAL, M.F.. Additive neuroprotective efects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 576–582, 2004.

KRÄMER, G.. Epilepsy in the elderly: some clinical and pharmacotherapeutic aspects. **Epilespsia**, v. 42, p. 55-59, 2001.

KUPFERBERG, H.. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 42, p. 7-12, 2001.

LAWLER, J.M.; BARNES, W.S.; WU, G.; SONG, W.; DEMAREE, S.. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 47–52, 2002.

LECUONA, E.; LUQUÍN, S.; AVILA, J.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; MARTÍN-VASALLO, P.. Expression of the beta 1 and beta 2(AMOG) subunits of the Na,K-ATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 167-174, 1996.

LEES, G.J.; LEHMANN, A.; SANDBERG, M.; HAMBERGER, A.. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 11, p. 159-162, 1990.

LI, S.; STYS, P.K.. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, p. 675-683, 2001.

LINGREL, J.B.. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, p. 263-270, 1992.

LOGVINENKO, N.S.; DULUBOVA, I.; FEDOSOVA, N.; LARSSON, S.H.; NAIRN, A.C.; ESMANN, M.; GREENGARD, P.; APERIA, A.. Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na+,K(+)-ATPase affects its conformational equilibrium. **Proceedings of National Academy Science United States of America**, v. 20, p. 9132-9137, 1996.

LOTHMAN, E.W.; REMPE, D.A.; MANGAN, P.S.. Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p.841-848, 1995.

MAGNI, D.V.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; FIORENZA, N.G.; FIGHERA, M.R.; FERREIRA, J.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Research**, v. 14, p. 336-345, 2007.

MAK, C.S.; WALDVOGEL, H.J.; DODD, J.R.; GILBERT, R.T.; LOWE, M.T.; BIRCH, N.P.; FAULL, R.L.; CHRISTIE, D.L.. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, p. 71-85, 2009.

MALCON, C.; KADDURAH-DAOUK, R.; BEAL, M.F.. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. **Brain Research**, v. 860, p. 195-198, 2000.

MALFATTI, C.R.; ROYES, L.F.; FRANCESCATO, L.; SANABRIA, E.R.; RUBIN, M.A.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F.. Intrastriatal methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na+,K+-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. **Epilepsia**, v. 44, p. 761-767, 2003.

MALLICK, B.N.; ADYA, H.V.; FAISAL, M.. Norepinephrine-stimulated increase in Na+, K+-ATPase activity in the rat brain is mediated through alpha1A-adrenoceptor possibly by dephosphorylation of the enzyme. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 1574-1578, 2000.

MALLINSON, J.; MEISSNER, J.; CHANG, K.C.. Calcineurin signaling and the slow oxidative skeletal muscle fiber type. **International Review of Cell and Mollecular Biology**, v. 277, p. 67-101, 2009.

MARCAIDA, G.; KOSENKO, E.; MIÑANA, M.D.; GRISOLÍA, S.; FELIPO, V.. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na+,K(+)-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, p. 99-104, 1996.

MATSUMOTO, H.; AJMONE, M.; MARSAN, C.. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. **Experimental Neurology**, v. 9, p. 286-304, 1964.

MCCOLL, C.D.; HORNE, M.K.; FINKELSTEIN, D.I.; WONG, J.Y.; BERKOVIC, S.F.; DRAGO, J.. Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 234-243, 2003.

MCLAUGHLIN, B.A.; NELSON, D.; SILVER, I.A.; ERECINSKA, M.; CHESSELET, M.F.. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v. 86, p. 279-290, 1998.

McMORRIS, T.; HARRIS, R.C.; HOWARD, A.N.; LANGRIDGE, G.; HALL, B.; CORBETT, J.. Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 21-28, 2007a.

McMORRIS, T.; MIELCARZ, G.; HARRIS, R.C.; SWAIN, J.P.; HOWARD, A.. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. Neuropsychology, **Development and Cognition**, v. 28, p. 517-528, 2007b.

MIKATI, M.A.; KURDIT, R.M.; RAHMEH, A.A.; FARHAT, F.; ABU RIALY, S.; LTEIF, L.; FRANCIS, E.; GEHA, G.; MARAASHLI, W.. Effects of creatine and cyclocreatine supplementation on kainate induced injury in pre-pubescent rats. **Brain Injury**, v. 18, p. 1229-1241, 2004.

MOBASHERI, A.; AVILA, J.; CÓZAR-CASTELLANO, I.; BROWNLEADER, M.D.; TREVAN, M.; FRANCIS, M.J.; LAMB, J.F.; MARTÍN-VASALLO, P.. Na+, K+-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports**, v. 20, p. 51-91, 2000.

MODY, I.; LAMBERT, J.D.; HEINEMANN, U.. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 57, p. 869-888, 1987.

MOREIRA, S.R.. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**, v. 3, p. 107-122, 2004.

MOSELEY, A.E.; WILLIAMS, M.T.; SCHAEFER, T.L.; BOHANAN, C.S.; NEUMANN, J.C.; BEHBEHANI, M.M.; VORHEES, C.V.; LINGREL, J.B..

Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 616-626, 2007.

MUNHOZ, C.D.; KAWAMOTO, E.M.; DE SA LIMA, L.; LEPSCH, L.B.; GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; SCAVONE, C.. Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, p. 115-123, 2005.

NETO, J.G.; MARCHETTI, R.L.. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, p. 323-328, 2005.

NISHI, A.; FISONE, G.; SNYDER, G. L.; DULUBOVA I.; APERIA, A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.. Regulation of Na+, K+-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 1492-1501, 1999b.

NISHI, A.; SNYDER, G. L.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 2015-2021, 1999a.

O'GORMAN, E.; BEUTNER, G.; DOLDER, M.; KORETSKY, A.P.; BRDICZKA, D.; WALLIMANN, T.. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. **FEBS Letters**, v. 414, p. 253-257, 1997.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behavioural Brain Research**, v. 187, p. 200-204, 2008.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; MYSKIW, J.C.; FIORENZA, N.G.; MELLO, C.F.. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, p. 721-728, 2004.

PAN, J.; W.; TAKAHASHI, K.. Cerebral energetic effects of creatine supplementation in humans. American Journal of Physiology. **Regulatory Integrative Compomparative**, v. 292, p. 1745-1750, 2007.

PATRIZI, S.; HOLMES, G.L.; ORZALESI, M.; ALLEMAND, F.. Neonatal seizures: characteristics of EEG ictal activity in preterm and full-term infants. **Brain Development**, v. 25, p. 427-437, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C.. The rat brainin stereotaxic coordinates. **Academic Press,** San Diego, 1986.

PENG, L.; MARTIN-VASALLO, P.; AND SWEADNER, K.J.. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. **The Journal Neuroscience**, v. 17, p. 3488-3502, 1997.

PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A.. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacological Reviews**, v. 53 p. 161-76, 2001.

PRASS, K.; ROYL, G.; LINDAUES, U.; FREYER, D.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; STOKLER-IPSIROGLU, G.; WALLIMANN, T.; PRILLER, J.. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. **Journal of Cerebral and Blood Flow Metabolism**, v. 27, p. 452-459, 2007.

PUUSEPP, H.; KALL, K.; SALOMONS, G.S.; TALVIK, I.; MÄNNAMAA, M.; REIN, R.; JAKOBS, C.; OUNAP, K.. The screening of SLC6A8 deficiency among Estonian families with X-linked mental retardation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 147, 2009.

RABCHEVSKY, A.G.; SULLIVAN, P.G.; FUGACCIA, I.; SCHEFF, S.W.. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 20, p. 659-669, 2003.

RAE, C.; DIGNEY, A.L.; McEWAN, S.R.; BATES, T.C.. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Proceeding Biological Sciences**, v. 270, p. 2147-2150, 2003.

RAMBO, L.M.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; LIMA, F.D.; SOUZA, M.A.; SILVA, L.F.; RETAMOSO, L.T.; CORTE, C.L.; PUNTEL, G.O.; DE AVILA, D.S.; SOARES, F.A.; FIGHERA, M.R.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 55, p. 333-340, 2009.

RAUCA, C.; ZERBE, R.; JANTZE, H.. Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. **Brain Research**, v. 847, p. 347-351, 1999.

ROSENFELD, J.; KING, R.M.; JACKSON, C.E.; BEDLACK, R.S.; BAROHN, R.J.; DICK, A.; PHILLIPS, L.H.; CHAPIN, J.; GELINAS, D.F.; LOU, J.S.. Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v. 9, p. 266-272, 2008

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.G.; MALFATTI, C.R.; SCHNEIDER, P.H.; BRAGA, A.L.; WAJNER, M.; MELLO, C.F.. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 118, p. 1079-1090, 2003.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; DA, SILVA, A.C.; PRIEL, M.R.; UEDA, E.S.; CALIXTO, J.B.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F.. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. **Neurochemistry International**, v. 53, p. 33-37, 2008.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; MYSKIW, J.C.; FIORENZA, N.G.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F.. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 136-144, 2006.

RYU, H.; ROSAS, H.D.; HERSCH, S.M.; FERRANTE, R.J.. The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 108, p. 193-207, 2005.

SAKELLARIS, G.; KOTSIOU, M.; TAMIOLAKI, M.; KALOSTOS, G.; TSAPAKI, E.; SPANAKI, M.; SPILIOTI, M.; CHARISSIS, G.; EVANGELIOU, A.. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **The Journal of Trauma**, v. 61, p. 322-329, 2006.

SCHEFF, S.W.; DHILLON, H.S.. Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 469-479, 2004.

SEMPERE, A.; FONS, C.; ARIAS, A.; RODRÍGUEZ-POMBO, P.; MERINERO, B.; ALCAIDE, P.; CAPDEVILA, A.; RIBES, A.; DUQUE, R.; EIRÍS, J.; POO, P.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, E.; CAMPISTOL, J.; ARTUCH, R.. Cerebral creatine deficiency: first Spanish patients harbouring mutations in GAMT gene**. Medicina Clinica (Barcelona)**, v. 21, p. 745-749, 2009.

SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; BRAVI, G.; PICCOLI, G.; CURCI, R.; BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; AGOSTINI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V.. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 40 p. 837-849, 2006.

SHEFNER, J.M.; CUDKOWICZ, M.E.; SCHOENFELD, D.; CONRAD, T.; TAFT, J.; CHILTON, M.; URBINELLI, L.; QURESHI, M.; ZHANG, H.; PESTRONK, A.; CARESS, J.; DONOFRIO, P.; SORENSON, E.; BRADLEY, W.; LOMEN-HOERTH, C.; PIORO, E.; REZANIA, K.; ROSS, M.; PASCUZZI, R.; HEIMAN-PATTERSON, T.; TANDAN, R.; MITSUMOTO, H.; ROTHSTEIN, J.; SMITH-PALMER, T.; MACDONALD, D.; BURKE, D.. A clinical trial of creatine in ALS. **Neurology**, v. 63, p. 1656-1661, 2004.

SHNEKER, B.F.; FOUNTAIN, N.B.. Epilepsy. **Disease-a-Month**, v. 49, p. 426-478, 2003.

SILVA, C.G.; SILVA, A.R.; RUSCHEL, C.; HELEGDA, C.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.. Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. **Metabolism Brain Disease**, v. 15, p. 123-131, 2000.

SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; RAMBO, L.M.; RIBEIRO, L.R.; LIMA, F.D.; DALLA, CORTE, L.C.; SILVA, L.F.; RETAMOSO, L.T.; DALLA, CORTE, C.L.; PUNTEL, G.O.; DE, AVILA, D.S.; SOARES, F.A.; FIGHERA, M.R.; DE,MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na+, K+-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, p. 811-823, 2009.

SPEER, O.; NEUKOMM, L.J.; MURPHY, R.M.;ZANOLLA, E.; SCHLATTNER, U.; HENRY, H.; SNOW, R.J.; WALLIMANN, T.. Creatine transporters: a reappraisal. **Mollecular and Cellular Biochemistry**, v. 1-2, p. 256-257; 407-424, 2004.

STAHL, WL.; HARRIS, WE.. Na+,K+-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Advances Neurology**, v. 44, p.681-693, 1986.

STÖCKLER, S.; HOLZBACH, U.; HANEFELD, F.; MARQUARDT, I.; HELMS, G.; REQUART, M.; HÄNICKE, W.; FRAHM, J.. Creatine de¢ciency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism, **Pediatric Research**, v. 36, p. 409-413, 1994.

SURGES, R.; THIJS, R.D.; TAN, H.L.; SANDER, J.W.. Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. **Nature Reviews. Neurology**, v. 9, p. 492-504, 2009.

TASKER, J.G.; DUDEK, F.E. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. **Neurochemistry Research**, v. 16, p. 251-262, 1991.

THARP, B.R.. Neonatal seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 43, p. 2-10, 2002.

THERIEN, A.G.; BLOSTEIN, R.. Mechanisms of sodium pump regulation. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 279, p.541-566, 2000.

THOMAS, K.. Justus von Liebig. **The Journal of Nutrition**, v. 7, p. 2-12, 1934.

UDANI, V.. Evaluation and management of intractable epilepsy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 67, p. 61-70, 2000.

VALENZUELA, M.J.; JONES, M.; WEN, W.; RAE, C.; GRAHAM, S.; SHNIER, R.. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. **Neuroreport**, v. 14, p. 1333–1337, 2003.

VANCINI, R.L.; DE LIRA, C.A.; DA SILVA, S.G.; DE LIMA, C.; MINOZZO, F.C.; DA SILVA, A.C.; SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.. Epilepsia e atividade física: estudos em humanos e animais. **Motriz**, v. 14, p. 196-206, 2008.

VIELHABER, S.; KUDIN, A.P.; KUDINA, T.A.; STILLER, D.; SCHEICH, H.; SCHOENFELD, A.; FEISTNER, H.; HEINZE, H.J.; ELGER, C.E.; KUNZ, W.S.. Hippocampal N-acetyl aspartate levels do not mirror neuronal cell densities in creatine-supplemented epileptic rats, **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 2292-300, 2003.

WALCZAK, T.S.. Neocortical temporal lobe epilepsy: characterizing the syndrome. **Epilepsia**, v. 36, p. 633-635, 1995.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO T.. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neuroscience Research**, v. 42 p. 279–85, 2002.

WICK, M.; FUJIMORI, H.; MICHAELIS, T.; FRAHM, J.. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 42, p. 798-802, 1999.

WILLIAMS, M.H.; Branch, J.D.. Creatine supplementation and exercise performance: an update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, p. 216-234, 1998.

WYSE A.T.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M.. Methylmalonate administration decreases Na+,K+-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2331-2334, 2000.

WYSS M.; KADDURAH-DAOUK R.. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1107-213, 2000.

WYSS, M.; SCHULZE, A.. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? **Neuroscience**, v. 112, p. 243-260, 2002.

ZHU, S.; LI, M.; FIGUEROA, B.E.; LIU, A.; STAVROVSKAYA, I.G.; PASINELLI, P.; BEAL, M.F.; BROWN, R.H.; JR, KRISTAL, B.S.; FERRANTE, R.J.; FRIEDLANDER, R.M.. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 5909-5912, 2004.