



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**O PAPEL DA CREATINA E DO EXERCÍCIO
FÍSICO NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Leonardo Magno Rambo

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

PPGOTOX/UFSM, RS

RAMBO, Leonardo Magno

Doutor

2013

**O PAPEL DA CREATINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO
NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

por

Leonardo Magno Rambo

Tese apresentada ao curso de doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

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

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**O PAPEL DA CREATINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS
CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL
EM RATOS**

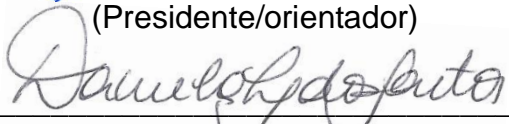
elaborada por
Leonardo Magno Rambo

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

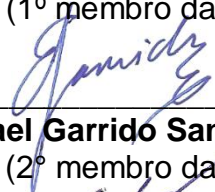
COMISSÃO EXAMINADORA:



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



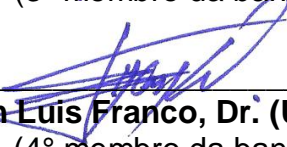
Daniela Lopes dos Santos, Dra. (UFSM)
(1º membro da banca)



Emilio Rafael Garrido Sanabria, PhD. (UTB)
(2º membro da banca)



Guilherme Bergamaschi Bresciani, Dr. (UFSM)
(3º membro da banca)



Jeferson Luis Franco, Dr. (UNIPAMPA)
(4º membro da banca)

Santa Maria, 31 de janeiro de 2013.

*Esta tese é dedicada à minha avó Esther (in memoriam),
meus pais Scheila e Antônio
e à minha namorada, Cinara.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Aos meus pais, Rogério e Scheila, minhas irmãs Chris e Carol, meu afilhado Arthur e minha avó Esther (*in memoriam*), pela base familiar.

A Cinara, minha namorada, companheira e amiga, por todo o apoio e incentivo durante a caminhada até aqui; por ter entendido e aguentado os cinco meses de distância, em decorrência dos estudos; pelos incontáveis dias, noites e madrugadas de estudo e de escrita da tese. Obrigado por estar ao meu lado, por apostar e acreditar em mim.

Aos meus orientadores, exemplos e amigos Luiz Fernando e Mauro, obrigado por todos os ensinamentos e exemplos pessoais e profissionais; por serem os responsáveis pelo meu conhecimento científico.

Ao meu orientador no exterior, Professor Emílio, um exemplo de pesquisador, professor e de pessoa, muito obrigado por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos neste curto período de tempo, porém, de grande crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas e amigos do BIOEX. Todos sabem o quanto foram e são importantes para o desenvolvimento desta tese.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade de estar encerrando mais esta etapa na minha vida acadêmica;

A *The University of Texas at Brownsville*, por me acolher como um de seus alunos.

A *Latin American Summer School on Epilepsy*, e a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, pelo apoio financeiro e pelo período de ensinamentos essenciais para a minha formação acadêmica.

Ao CNPQ e a CAPES pelo apoio financeiro recebido.

"Os homens pensam que a epilepsia é divina meramente porque não a compreendem. Se eles denominassem divina qualquer coisa que não compreendem, não haveria fim para as coisas divinas." (Hipócrates)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

O PAPEL DA CREATINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS 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, 31 de janeiro de 2013.

A epilepsia está entre as desordens neurológicas graves mais comuns no mundo. Apesar dos avanços no estudo patofisiológico e no tratamento dessa condição, cerca de 30% dos pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento farmacológico disponível atualmente. Nesse sentido, a busca por novas terapias que possam auxiliar no tratamento desta condição é essencial. A presente tese buscou investigar o efeito e os mecanismos envolvidos na suplementação com creatina e no exercício físico, sobre um modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Os resultados aqui apresentados demonstraram que o exercício físico, a suplementação aguda e crônica com creatina assim como a combinação entre o exercício físico e a suplementação crônica com creatina protegeram das convulsões induzidas por PTZ. Verificou-se também que o exercício físico aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e o conteúdo de grupamentos tióis *per se*. Além disso, a suplementação crônica com creatina também aumentou o conteúdo de grupamentos tióis e a administração aguda com creatina aumentou o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) *per se*. Somando-se a isso, tanto a suplementação crônica com creatina, quanto o programa de atividade física, ou sua combinação, controlaram o aumento na lipoperoxidação e na carbonilação de proteínas, a redução no conteúdo de grupamentos tióis não-protéicos e da atividade das enzimas SOD, Catalase (CAT) e Na^+, K^+ -ATPase, induzidas pela injeção de PTZ. Semelhantemente, o tratamento agudo com creatina preveniu contra a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e xantina oxidase, redução no potencial de membrana mitocondrial e nos conteúdos de ATP e ADP, aumento nos conteúdos de AMP, Adenosina, Inosina, Ácido Úrico, proteína carbonilada e lipoperoxidação, após convulsões induzidas por PTZ. Esses resultados indicam que o aumento nas defesas antioxidantes e a manutenção nos estoques energéticos exercidos pela atividade física e pela suplementação aguda e crônica com creatina podem ser os possíveis mecanismos envolvidos na proteção contra as convulsões e as alterações neuroquímicas induzidas pela injeção de PTZ. Levando em conta a alta demanda energética presente em desordens com fenótipo epiléptico, além do conhecido componente oxidativo envolvido tanto na epileptogênese quanto na propagação de crises, a atividade física e a suplementação com creatina podem ser consideradas potenciais terapias auxiliares para o tratamento de condições que apresentem fenótipo epiléptico.

Palavras-chave: Creatina. Exercício Físico. Epilepsia.

ABSTRACT

Thesis of PhD. Degree
Postgraduate Program in Biological Science: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

THE ROLE OF CREATINE AND EXERCISE TRAINING ON PENTYLENETETRAZOL-INDUCED SEIZURES 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, January, 31th, 2013.

Epilepsy is among the most common neurological disorders around the world. Even with the advances in the pathophysiological studies and treatment of this condition, about 30% of the patients do not present satisfactory response to pharmacological treatment available today. In this sense, the searches for new therapies that can help the treatment of this condition are essential. The present thesis aimed to investigate the effect and the mechanisms involved in creatine supplementation and exercise training on a seizure model induced by PTZ. The results presented here showed that exercise training, acute and chronic creatine supplementation as well as the combination between exercise training and chronic creatine supplementation, protected against PTZ-induced seizures. Also, exercise training increased the SOD activity and the thiol groups content *per se*. Additionally, the chronic creatine supplementation also increased the thiol group content and the acute creatine administration increased the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) *per se*. Moreover, also the chronic supplementation and the physical activity program, as well as their combination controlled the increase in the lipoperoxidation and protein carbonylation, the decrease in thiol group content and in the activity of SOD, CAT and Na⁺,K⁺-ATPase, induced by the injection of PTZ. In the same way, the acute creatine treatment prevented against the decrease in the Na⁺,K⁺-ATPase and xanthine oxidase activity, the decrease in the ATP and ADP content, the increase in the AMP, adenosine, inosine, uric acid content, carbonylated protein and lipoperoxidation, after seizures induced by PTZ. The results indicate that the increase in antioxidant defenses and the maintenance in the energetic storages promoted by exercise training and acute and chronic creatine supplementation can be the putative mechanisms involved in protection against seizures and neurochemical changes induced by PTZ injection. Taking into account the high energetic requirement in disorders with epileptic phenotype, and the known oxidative component involved also in epileptogenesis and in spread of seizures, the exercise training and the creatine supplementation can be considered adjunct therapies in potential to treatment of conditions that present epileptic phenotype.

Key-Words: Creatine. Physical exercise. Epilepsy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. - antes de Cristo

AdoHcy - S-adenosil-L-homocisteína

AdoMet - S-adenosil-L-metionina

ADP - Difosfato de adenosina

AGAT - L-arginina: glicina amidinotransferase

AMP - Monofosfato de adenosina

AP-5 - 2-amino-5-fosfopentanoato

Arg - Arginina

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF - *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo)

CA1 - *Cornu Ammonis 1*

CAT - Catalase

CaV - Canal de Cálcio dependente de voltagem

CBZ - Carbamazepina

Cr - Creatina

Crn - Creatinina

CrT - Transportador de creatina

CK - Creatina quinase

d.C. - depois de Cristo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ESM - Etosuximida

GAA - Guanidino acetato

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GABA_A - Receptor ionotrópico de GABA

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

GBP - Gabapentina

Gly - Glicina

GPx - Glutathione Peroxidase

ILAE - *International League Against Epilepsy* (Liga Internacional Contra a Epilepsia)

LEV - Levetiracetam

LTG - Lamotrigina

Mg²⁺ - Íon magnésio

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

NGF - *Nerve Growth Factor* (Fator de Crescimento Nervoso)

NMDA - N-metil-D-aspartato

OXC - Oxicarbazepina

PB - Fenobarbital

PHT - Fenitoína

PCr - Fosfocreatina

PGC-1 α - Pro- γ Co-ativador-1 α

PTZ - Pentilenotetrazol

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

STM - Sultiame

TPM - Topiramato

TrkB - Receptor Tirosina Quinase B

VGB - Vigabatrina

VPA - Valproato

ZNS - Zonisamida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das crises epiléticas	20
Figura 2	Relação entre o número de fármacos antiepiléticos administrados e o percentual de resposta terapêutica	22
Figura 3	Representação esquemática da biossíntese da creatina	31
Figura 4	Estrutura tridimensional da creatina e da fosfocreatina, com a polaridade das moléculas	32
Figura 5	Metabolismo da creatina	33
Figura 6	Reação da enzima creatina quinase	35
Figura 7	Desenho experimental do artigo I	48
Figura 8	Desenho experimental do artigo II - Análises comportamentais e bioquímicas	58
Figura 9	Desenho experimental do artigo II - Análises comportamentais e eletroencefalográficas	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPILEPSIA	16
1.1.1 <i>Histórico</i>	16
1.1.2 <i>Epidemiologia</i>	17
1.1.3 <i>Definições</i>	18
1.1.4 <i>Classificações</i>	19
1.1.4.1 <i>Crises Epilépticas</i>	19
1.1.4.2 <i>Epilepsias</i>	19
1.1.5 <i>Tratamentos</i>	21
1.1.6 <i>Modelos experimentais</i>	23
1.1.6.1 <i>Modelo de convulsões induzidas por PTZ</i>	24
1.1.7 <i>Epilepsia e Estresse Oxidativo</i>	25
1.1.8 <i>Epilepsia e Na⁺,K⁺-ATPase</i>	27
1.1.9 <i>Epilepsia e a Via de Degradação de Purinas</i>	29
1.2 CREATINA	30
1.2.1 <i>Histórico</i>	30
1.2.2 <i>Síntese</i>	31
1.2.3 <i>Transporte, Metabolismo e Farmacocinética</i>	33
1.2.4 <i>Papel em doenças neurológicas</i>	35
1.2.4.1 <i>Creatina e Epilepsia</i>	36
1.2.5 <i>Ações independentes do metabolismo energético</i>	37
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO	39
1.3.1 <i>Histórico</i>	39
1.3.2 <i>Exercício Físico e SNC</i>	40
1.3.3 <i>Exercício Físico e Epilepsia</i>	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
2.2.1 <i>Artigo I</i>	44

2.2.2 <i>Artigo II</i>	45
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	46
3.1 ARTIGO I: ADDITIVE ANTICONVULSANT EFFECTS OF CREATINE SUPPLEMENTATION AND PHYSICAL EXERCISE AGAINST PENTYLENETETRAZOL-INDUCED SEIZURES	47
3.1.1 <i>Título em português</i>	47
3.1.2 <i>Autores</i>	47
3.1.3 <i>Periódico e ano da publicação</i>	47
3.1.4 <i>Desenho experimental</i>	48
3.2 ARTIGO II: ACUTE CREATINE ADMINISTRATION IMPROVES MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND PROTECTS AGAINST PENTYLENETETRAZOL-INDUCED SEIZURES.....	57
3.2.1 <i>Título em português</i>	57
3.2.2 <i>Autores</i>	57
3.2.3 <i>Periódico e ano da publicação</i>	57
3.2.4 <i>Desenho Experimental</i>	57
4 DISCUSSÃO	71
5 CONCLUSÕES	77
6.1 ARTIGO I.....	78
6.2 ARTIGO II.....	79
6 BIBLIOGRAFIA	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

1.1.1 Histórico

Os primeiros manuscritos referentes à epilepsia são datados de aproximadamente 2000 a.C.. Nesta época, na Babilônia, acreditava-se que a epilepsia era uma doença de natureza sobrenatural e, portanto, era tratada de forma espiritual. Os diferentes tipos de epilepsia e, por consequência, diferentes manifestações motoras, eram associados a nomes de diferentes espíritos ou deuses, geralmente malignas (MOREIRA, 2004).

Na Grécia antiga, a epilepsia era considerada uma doença sagrada (*morbus sacer*). Os gregos acreditavam que quando uma pessoa apresentava uma crise epiléptica, era como se tivesse sido “tocada” por um deus e, portanto, passava a ser considerado um sacerdote (YACUBIAN, 2000). Foi na Grécia antiga também que surgiu o nome “epilepsia”, derivado do termo grego *epilhyia*, que significa surpresa, ser apanhado de repente, ser acometido. Já em 400 a.C., Hipócrates, o pai da Medicina, escreveu um texto no qual propôs que a epilepsia não era sagrada nem divina, e sim, uma doença relacionada ao cérebro, com possível origem hereditária, tentando fazer uma desconexão dos fenômenos físicos com as forças sobrenaturais. Muitos anos depois, em aproximadamente 129 d.C., Galeno fez as primeiras classificações das diferentes manifestações epiléticas, separando-as em: causas desconhecidas e as que eram resultado de outras doenças (MOREIRA, 2004).

Na idade média, diferentemente do que se acreditava na Grécia antiga, a epilepsia era considerada uma doença de origem demoníaca (*morbus demoniacus*). As pessoas com epilepsia eram perseguidas e, muitas vezes, queimadas nas fogueiras, como se fossem bruxos ou feiticeiros (MOREIRA, 2004). Além disso, no início do século XX se acreditava que a epilepsia era

uma doença transmissível pela respiração. Foi um período no qual se preconizou a vacinação contra o *Bacillus epilepticus* (YACUBIAN, 2000).

Quando se trata das bases da epileptologia moderna, destaca-se Hughlings Jackson, que definiu a epilepsia como “uma descarga súbita, excessiva e rápida da substância cinzenta”, definição que ainda hoje é aceita por estudiosos da área. Além disso, em 1879, Jackson estabeleceu as bases neuroanatômicas para os fenômenos epilépticos em seu texto “*Lectures on the Diagnosis of Epilepsy*” (GOMES, 2006). Atualmente, a epilepsia é um assunto desmistificado, porém, ainda é alvo de grande preconceito, devido a ideias controversas e errôneas sobre o assunto, levando a pessoa com epilepsia a ser discriminada, muitas vezes, pela sociedade (THOMAS; NAIR, 2011).

1.1.2 Epidemiologia

A epilepsia está entre os mais comuns transtornos neurológicos graves, atingindo cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que 80% desses se encontram nos países em desenvolvimento (OMS, 2012). Pessoas de todas as raças, sexos, condições socioeconômicas e regiões são acometidas. Elas podem sofrer consequências profundas, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. Também se associam à epilepsia problemas sociais e econômicos diretos e indiretos, como gastos relacionados à internação hospitalar, medicamentos, além da redução na capacidade de trabalho (NETO; MARCHETTI, 2005). Estudos epidemiológicos relatam também que pelo menos 10% de toda a população terá uma ou mais crises epilépticas ao longo da vida (HAUSER; ANNEGERS; ROCCA, 1996; OMS, 2012).

A prevalência de epilepsia ativa no mundo está entre 4 a 10 casos a cada mil habitantes (SANDER; SHORVON, 1996). Estudos de países desenvolvidos e de alguns países em desenvolvimento sugerem que a incidência de epilepsia é maior nos países em desenvolvimento: As taxas de incidência anual de epilepsia oscilam entre 40 e 70/100.000 nos países desenvolvidos, se elevando para 122 a 190/100.000 nos países em

desenvolvimento (SANDER; SHORVON, 1996). 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 (SENANAYAKE; ROMAN, 1993; CARPIO; HAUSER, 2009).

A incidência da epilepsia varia também com a idade, com as maiores taxas ocorrendo na infância, caindo na vida adulta e aumentando novamente por volta dos 65 anos (KRAMER, 2001). A duração da epilepsia é frequentemente 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), embora não existam estudos demonstrando relação causal entre as crises febris e o desenvolvimento de epilepsia. Cabe salientar que 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).

1.1.3 Definições

Definir termos é de grande importância para a universalização das discussões, do entendimento e dos conceitos em relação à epilepsia. As definições da Comissão de Classificação e Terminologia da *International League Against Epilepsy* (ILAE) são baseadas em conceitos atuais e levam em conta técnicas modernas, como a neuroimagem, genômica e conceitos de biologia molecular (BERG et al., 2010). Neste sentido, as definições mais adequadas de epilepsia, crise epiléptica e convulsão são aquelas descritas por Fisher e colaboradores em 2005. Epilepsia é um distúrbio cerebral

caracterizado por uma predisposição sustentada de gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição, devendo haver pelo menos uma crise epilética no quadro clínico do paciente. Crise epilética é definida como a ocorrência de sinais e sintomas decorridos de uma hipersincronia neuronal cerebral. Já a convulsão é definida como a manifestação motora da crise epilética (FISHER et al., 2005).

1.1.4 Classificações

1.1.4.1 Crises Epiléticas

A classificação das crises epiléticas se baseia na sua descrição clínica e nos achados eletroencefalográficos: são divididas basicamente em crises focais ou crises generalizadas. As crises focais são definidas como crises epiléticas que se originam em redes limitadas a um hemisfério cerebral, no qual apresentam padrões de propagação semelhantes entre as crises, os quais podem envolver o hemisfério contralateral (BERG et al., 2010). As crises generalizadas são consideradas como originárias em algum ponto do encéfalo e que rapidamente ativam redes neuronais bilaterais, mas não necessariamente todo o córtex cerebral. Ainda, as crises generalizadas podem ser assimétricas e semelhantes às crises focais, porém se diferem por não apresentar um padrão entre cada crise (BERG et al., 2010). A classificação das crises pode ser melhor visualizada na figura 1.

1.1.4.2 Epilepsias

Na classificação das síndromes, novos termos e conceitos vêm sendo adotados pela ILAE (BERG et al., 2010). Neste sentido, quanto à etiologia, as síndromes podem ser classificadas como: Genética, que diz respeito a algum

Classificação das Crises Epilépticas ^a
Crises generalizadas
Tônico-clônica
Ausência
Típica
Atípica
Ausência com características especiais
Ausência mioclônica
Mioclônica palpebrar
Mioclônica
Mioclônica atônica
Mioclônica tônica
Clônica
Tônica
Atônica
Crises focais
Desconhecidos
Espasmos epilépticos
^a Crise que não pode ser claramente diagnosticada dentro de uma das categorias precedentes deve ser considerada “não classificada”, até que maiores informações permitam o seu diagnóstico mais preciso. Entretanto, isto não é considerado uma categoria de classificação.

Figura 1: Classificação das crises epilépticas (traduzido de BERG et al., 2010)

defeito genético que pode contribuir diretamente para a epilepsia, tendo como principal sintoma do distúrbio as crises (BERG et al., 2010). Ressalta-se como um exemplo as canalopatias (por exemplo, uma mutação no canal de Ca^{2+} CaV2.1 está relacionada ao desenvolvimento de crise de ausência)(OLIVEIRA et al., 2011). Outra classe corresponde às epilepsias estruturais/metabólicas, causadas por distúrbio estrutural/metabólico cerebral, como por exemplo, a esclerose tuberosa e a epilepsia pós-traumática (BERG et al., 2010). Por último, estão as epilepsias de causas desconhecidas, que neste caso podem ser genéticas, estruturais ou metabólicas (BERG et al., 2010).

Quanto à terminologia, as epilepsias podem ser classificadas em: Auto-Limitada, que tende a resolver espontaneamente com o tempo; Farmacorresponsiva, que tem grande possibilidade de ser controlada com

fármacos; Crises Focais, nas quais a semiologia das crises é descrita de acordo com características específicas subjetivas, como aura motora, autonômica e; Evoluindo para crise epiléptica bilateral, como tônica, clônica e tônico-clônica (BERG et al., 2010).

Os diagnósticos corretos de crises e síndrome são importantes e necessários para a realização de tratamentos bem sucedidos.

1.1.5 Tratamentos

Após o diagnóstico clínico, os pacientes são tratados com a droga antiepiléptica ideal, de primeira escolha, de acordo com a crise ou a síndrome epiléptica apresentada. A ILAE apresenta um guia no qual, baseado em evidências clínicas e experimentais, revisa e define os fármacos com melhor efeito ou mais eficazes no tratamento de epilepsias específicas (GLAUSER et al., 2006).

De acordo com Glauser e colaboradores (2006), para o tratamento de crises parciais da infância, recomenda-se a utilização de Oxcarbazepina (OXC) e, secundariamente, a Carbamazepina (CBZ), Fenobarbital (PB), Fenitoína (PHT), Topiramato (TPM) e Valproato (VPA). Já nas crises parciais do adulto, trata-se com CBZ e PHT, com menos evidências o VPA, Gabapentina (GBP), Lamotrigina (LTG), OXC, PB, TPM e Vigabatrina (VGB). Para as crises parciais em idosos utiliza-se a GBP e a LTG e, secundariamente, a CBZ. Para o tratamento de crises generalizadas tônico-clônicas na infância utiliza-se PB, TPM e VPA, sendo que a CBZ, PHT e OXC podem agravar esse tipo de crise e, desse modo, devem ser evitadas. No adulto, utiliza-se LTG, PB, TPM e VPA, evitando-se CBZ, OXC e PHT, pois podem agravar esse tipo de crises. Para o tratamento da crise de ausência infantil recomendam-se as terapias com Etosuximida (ESM), LTG e VPA. Para o tratamento da epilepsia benigna com espículas centro-temporais utiliza-se a CBZ e o VPA, sendo que, com menos evidências, pode-se utilizar GBP e Sultiame (STM). No tratamento da epilepsia mioclônica juvenil, recomenda-se a CBZ, Levetiracetam (LEV), TPM, VPA e

Zonisamida (ZNS), sendo que LTG, CBZ, OXC e PHT podem agravar esse tipo de epilepsia (GLAUSER et al., 2006).

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 do fármaco. Ainda assim, no caso de insucesso no tratamento com um único fármaco (monoterapia), existe a possibilidade da associação de fármacos, para os determinados tipos de síndromes (GLAUSER et al., 2006). A epilepsia farmacorresponsiva é a epilepsia na qual o paciente, recebendo o regime de fármacos antiepilépticos adequado, apresenta remissão de crises por um período de, no mínimo, 12 meses (KWAN et al., 2010). Para os casos não responsivos pode-se adicionar até três ou mais fármacos. O que se nota é que com a administração de um único fármaco se obtém um sucesso em cerca de 50% dos casos. Já nos casos de politerapia farmacológica, com a adição de até dois fármacos, é possível notar êxito em cerca de 70% dos pacientes. Entretanto, com a adição de três ou mais fármacos, não se obtém um acréscimo significativo de sucesso nos tratamentos, alcançando-se um platô quanto ao efeito da politerapia (Figura 2) (ELGER, 2003).

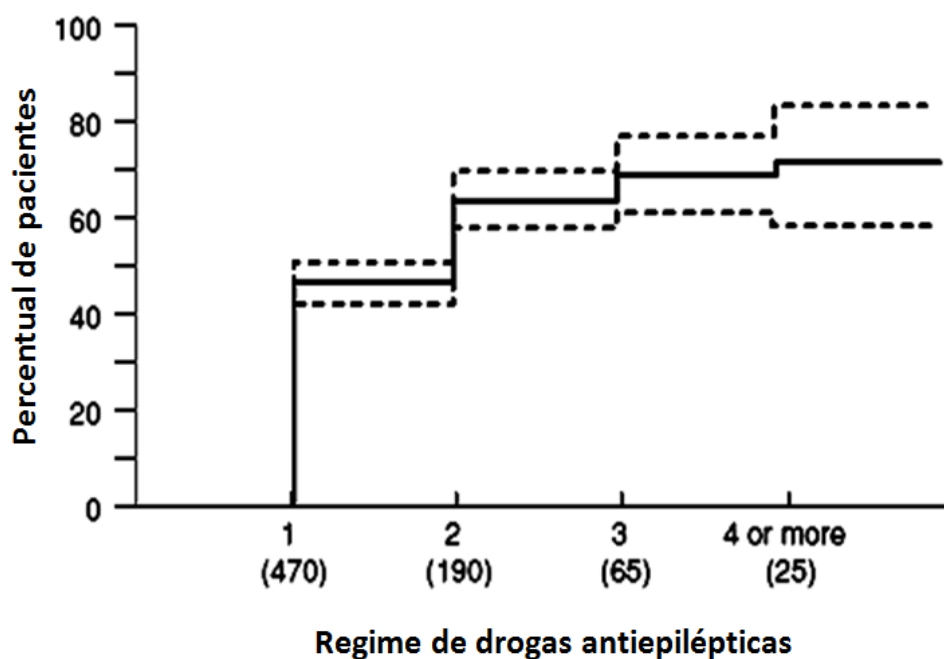


Figura 2: Probabilidade de pacientes recém-diagnosticados com epilepsia ficarem livres de crises, conforme o número de fármacos antiepilépticos administrados (ELGER, 2003).

Se, mesmo após o tratamento medicamentoso, com a politerapia, o paciente permanecer não responsivo, e as crises epiléticas continuarem não controladas, ele é classificado como paciente com epilepsia refratária. De acordo com a ILAE, a epilepsia farmacorresistente (ou refratária) é definida como a falha em se alcançar uma remissão de crises sustentada (mais de 12 meses) após o tratamento com dois fármacos antiepiléticos (seja em monoterapia ou em combinação), corretamente selecionados e adequadamente tolerados (KWAN et al., 2010).

Mesmo que o sucesso com a utilização das drogas antiepiléticas se aproxime de 70% dos pacientes, cerca de 30% ainda são classificados como refratários e, muitas vezes, não responsivos em mais de três tentativas terapêuticas, com a associação de drogas antiepiléticas. A ILAE define como o principal problema no tratamento das epilepsias a farmacorresistência (KWAN et al., 2010).

1.1.6 Modelos experimentais

Os modelos experimentais são essenciais para a compreensão 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 antiepilético.

Para uma melhor compreensão 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 epilética que produzem, sendo classificados em focais e generalizados. Além disso, os modelos podem ser divididos também em modelos crônicos (modelos que apresentam crises recorrentes) - onde se destacam os modelos induzidos por Ácido Caínico e o modelo da pilocarpina - e modelos agudos (modelo de crise isolada), no qual se destaca os modelos de eletrochoque máximo e de pentilenotetrazol.

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; MARSAN, 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; REMPE; MANGAN, 1995). Destacam-se, entre os modelos focais 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, como Bicuculina (TASKER; DUDEK, 1991) e redução nas concentrações de Mg^{2+} (MODY; LAMBERT; HEINEMANN, 1987). Para o estudo dos modelos *in vitro* utiliza-se, principalmente, técnicas de eletrofisiologia.

1.1.6.1 Modelo de convulsões induzidas por PTZ

Dentre os modelos *in vivo*, de convulsão generalizada, destaca-se o utilizado nesta tese; o modelo de convulsão induzida 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. Além disso, o presente composto 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).

Originalmente o PTZ era utilizado como um cardioestimulante, até ter sido demonstrado um significativo potencial convulsivante em ratos, camundongos, primatas e humanos (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006). O PTZ pode ser diluído em salina ou água e pode ser administrado pelas vias subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.). Mais comumente se utiliza a via i.p., sendo que as doses mais utilizadas nessa via alcançam um máximo de 100 mg/kg. A injeção de PTZ induz, geralmente, quatro fenômenos comportamentais: *freezing*, espasmos mioclônicos, convulsões clônicas, e convulsões generalizadas tônico-clônicas. Além disso, doses graduais de PTZ podem reproduzir esses tipos de crises específicas. Assim,

baixas doses podem induzir apenas o *freezing*, entretanto, já apresentando alterações nos sinais eletroencefalográficos. As altas doses podem induzir convulsões generalizadas. As manifestações convulsivas induzidas por PTZ se desenvolvem dentro de um período de 20 minutos após a aplicação (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006).

Em relação ao presente modelo foi descrito, em um estudo de ressonância magnética, que após a injeção de PTZ, em ratos, ocorre um aumento na ativação do núcleo talâmico anterior e no giro denteado hipocampal, além do córtex retrosplenial, antes do início das crises, sugerindo que a gênese das crises induzidas por PTZ ocorrem nessas regiões encefálicas (BREVARD et al., 2006). Em relação às alterações neuroquímicas induzidas por esse agente convulsivante, têm sido demonstradas importantes reduções no sistema antioxidante e, possivelmente por consequência, redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (RAUCA; ZERBE; JANTZE, 1999; ERAKOVIC et al., 2001; SOUZA et al., 2009). Nesse sentido, demonstrou-se também que o PTZ pode induzir crises por inibir essa enzima através de uma interação direta com a estrutura proteica (DUBBERKE; VASILETS; SCHWARZ, 1998). Além disso, em relação às alterações comportamentais induzidas por este modelo, sugere-se que o aumento na latência para o desenvolvimento das crises seja um forte indicativo de ação anticonvulsiva, visto que drogas como o diazepam e o clonazepam aumentam esse parâmetro (DE SARRO et al., 1996).

1.1.7 Epilepsia e Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), ou ambas (RONS) são continuamente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando as RONS são produzidas em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, elas podem causar prejuízo na função celular, apoptose e necrose, caracterizando o "estresse oxidativo". Esse desequilíbrio entre a produção celular de RONS e as defesas antioxidantes pode representar um mecanismo fundamental para as

doenças em seres humanos. A produção de RONS pode ser estimada pela determinação dos produtos formados após reação com proteínas, lipídios ou DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são fatores que não são somente resultado de convulsões, mas possivelmente também contribuem para o desenvolvimento de crises epiléticas e da epileptogênese. A ideia de um possível envolvimento da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo na epilepsia parte do conhecimento de que a epilepsia frequentemente ocorre em desordens mitocondriais inatas, tais como a epilepsia mioclônica com fibras vermelhas irregulares e àquelas associadas a encefalopatias juvenis (WALDBAUM; PATEL, 2010). O papel do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na redução do limiar das convulsões foi evidenciado em estudos com camundongos parcialmente deficientes (*knockout*, heterozigoto) em uma importante enzima antioxidante mitocondrial, a Superóxido Dismutase mitocondrial (SOD2 $-/+$). Estes animais geneticamente modificados apresentavam convulsões espontâneas conforme envelheciam (LIANG; PATEL, 2004). A incidência de epilepsia em humanos também aumenta com a idade (KRAMER, 2001). Neste sentido, o estresse oxidativo mitocondrial é um dos principais mecanismos do envelhecimento e de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade (FUJITA et al., 2012), sugerindo ainda mais o envolvimento da disfunção mitocondrial na geração das convulsões e na epileptogênese (WALDBAUM; PATEL, 2010).

Evidências sobre o envolvimento das ROS e da disfunção mitocondrial na epileptogênese e no desenvolvimento de crises são apresentadas por Bruce e Baudry (1995), que mostraram que convulsões induzidas por cainato resultam em aumento na oxidação de macromoléculas (BRUCE; BAUDRY, 1995). Além disso, vários estudos mostram que compostos com propriedades antioxidantes previnem da excitotoxicidade *in vitro* e *in vivo* induzidas por diferentes agentes convulsivantes (SCHNEIDER OLIVEIRA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005; TOME; FENG; FREITAS, 2010; SHIN et al., 2011). Alguns estudos suportam a ideia de que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem induzir crises epiléticas, como é o caso do aumento na produção de radicais livres, induzido por níveis aumentados de oxigênio, em situações de hipóxia-reoxigenação e isquemia-reperusão (JENSEN et al.,

1991; VELIOGLU et al., 2001). Outra forte evidência sobre o envolvimento da disfunção mitocondrial na epilepsia vem de um estudo que relata que uma mutação no DNA mitocondrial (mtDNA) está relacionada com a causa da epilepsia mioclônica (SHOFFNER et al., 1990).

De uma maneira geral, o objetivo de fármacos antiepilépticos é reduzir a excitabilidade de circuitos neuronais envolvidos na epileptogênese e, desta maneira, controlar a manifestação de crises epiléticas. Já, quanto à questão de desenvolvimentos de medicamentos para o tratamento da epilepsia, ressalta-se como uma das prioridades neste campo o desenvolvimento de novos fármacos que atuem controlando os mecanismos responsáveis pela epileptogênese. Considerando-se que o estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo de hiperexcitabilidade neuronal, terapias antioxidantes poderiam ser consideradas como possíveis tratamentos para auxiliar no controle da epileptogênese. Entretanto, uma questão ainda permanece em aberto: O estresse oxidativo é a causa ou a consequência da epilepsia? Apesar de ainda não se ter uma resposta exata, esta questão é amplamente discutida na literatura, sendo alvo de opiniões conflitantes (CANAFOLIA et al., 2001; PATEL, 2004; WALDBAUM; PATEL, 2010).

1.1.8 Epilepsia e Na^+, K^+ -ATPase

A enzima Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima extremamente sensível ao ataque de ROS. De acordo com Jamme e colaboradores (1995), a funcionalidade desta enzima é mais prejudicada pelo ataque de ROS aos lipídios da membrana do que por alterações estruturais na proteína em si. De acordo com esta ideia, Petrushanko (2006; 2007) demonstrou que variações no estado redox do neurônio podem modular a atividade desta enzima.

No cérebro, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais 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, a liberação de

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; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992). Ao encontro destes achados, 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; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992) e que mutações nos genes que codificam a subunidade α estão associadas com epilepsia em humanos (JURKAT-ROTT et al., 2004). Somando-se a isso, Clapcote e colaboradores (2009) demonstraram que uma mutação na isoforma catalítica $\alpha 3$ - que reduz a atividade desta enzima em cerca de 42% no cérebro de camundongos - está associada com a hiperexcitabilidade no sistema nervoso central, sugerindo que a Na^+, K^+ -ATPase pode estar envolvida no controle da atividade epileptogênica. Adicionalmente, uma mutação na isoforma $\alpha 2$ tem sido relacionada com enxaqueca hemiplégica esporádica e crises epiléticas em humanos (GALLANTI et al., 2008).

Neste sentido, Dubberke e colaboradores (1998) elegantemente demonstraram que o PTZ, um agente quimioconvulsivante clássico, inibe a enzima Na^+, K^+ -ATPase. 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). Tais achados reforçam a ideia de que a inibição desta enzima, por mecanismos variados, desde mutações até a inibição por ROS, pode estar envolvida na epileptogênese.

1.1.9 Epilepsia e a Via de Degradação de Purinas

Sabe-se que crises epiléticas são desencadeadas por uma hiperexcitabilidade e sincronia neuronal, isto significa que ocorrem um maior recrutamento e aumento na atividade das redes neuronais envolvidas nas crises. Por consequência desta demanda aumentada, ocorre também um aumento no consumo energético no encéfalo (CARMODY; BRENNAN, 2010). A Na^+, K^+ -ATPase, uma enzima responsável pelo controle da excitabilidade neuronal, por si só, consome cerca de 70% de todo o ATP utilizado pelo encéfalo, em situações fisiológicas (CLAUSEN; VAN HARDEVELD; EVERTS, 1991). Em situações patológicas, de hiperexcitabilidade neuronal, como a epilepsia, estes níveis de consumo energético aumentam. Sendo assim, se torna necessária uma circuitaria molecular que mantenha constante a disponibilidade de energia, para que os neurônios consigam manter sua homeostase, através de uma estreita relação entre a produção e o consumo de energia.

Considerando-se que a regulação dos níveis de ATP e seus metabólitos são cruciais, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, a via do catabolismo das purinas possui um importante papel na manutenção dos estoques de ATP (ATAULLAKHANOV; VITVITSKY, 2002). Por outro lado, o presente mecanismo aumenta a produção de ROS, através da enzima xantina oxidase (SATO et al., 2011). Neste contexto, tem sido sugerido que o aumento na atividade desta enzima exerce um importante papel na gênese e na manutenção de condições patológicas, tais como a epilepsia, uma vez que inibidores da xantina oxidase, como o alopurinol, têm sido utilizados como terapias adicionais no tratamento desta condição (TADA et al., 1991; ZAGNONI et al., 1994; TOGHA et al., 2007; LIANG et al., 2010). Neste sentido, terapias que possam melhorar o aporte energético para os neurônios

podem ser pensados como possíveis adjuvantes no tratamento da epilepsia, uma vez que poderiam reduzir a via de degradação de purinas, a atividade da enzima xantina oxidase e, por consequência, reduzir a geração de ROS e o estresse oxidativo oriundos desta via catabólica.

1.2 Creatina

1.2.1 Histórico

Em 1835, o cientista francês Michel Eugene Chevreul descobriu, em um extrato de carne, uma nova substância orgânica até então desconhecida, 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, as quais têm maior demanda energética e muscular, devido a necessidade de obter seu próprio alimento, apresentava cerca de 10 vezes mais creatina que as mesmas espécimes que eram 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, em repouso, de gatos outra substância relacionada à creatina: um composto fosforilado, o qual foi nomeado de fosfocreatina. Os mesmos autores relataram que após a contração muscular induzida por estímulo elétrico, as concentrações de fosfocreatina encontravam-se reduzidas, mas após um período de repouso, estes níveis retornavam às concentrações detectadas inicialmente. Estes estudos levaram os cientistas a concluir que a fosfocreatina estava envolvida com o gasto energético necessário para a contração muscular (FISKE; SUBBAROW, 1925).

Em 1932, o cientista alemão Karl Lohmann foi o primeiro a detectar, em músculos, a atividade 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 4). Apenas em 1934 Lohmann confirmou experimentalmente esta importante reação que, posteriormente, foi chamada de reação de Lohmann (WYSS; SCHULZE, 2002).

1.2.2 Síntese

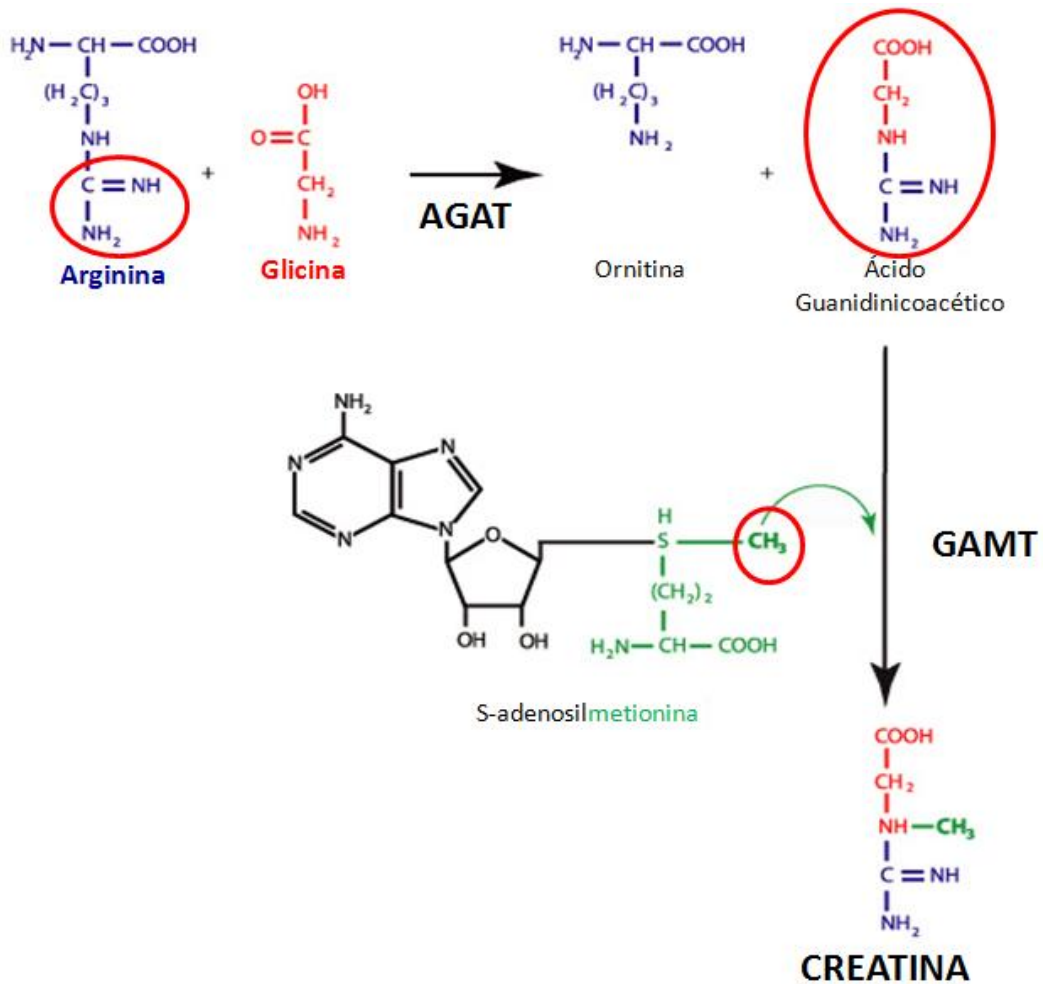


Figura 3. Representação esquemática da biossíntese da creatina. AGAT - L-arginina:glicina amidino transferase; GAMT - S-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase (adaptado de WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

A creatina (Figura 4) 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 (1 g), por uma reação de dois passos, envolvendo as enzimas L -arginina:glicina amidino transferase (AGAT) e S-adenosil- L -metionina:N-guanidinoacetato metil transferase (GAMT) (Figura 3). 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). Entretanto, alguns estudos relatam que a creatina administrada sistemicamente também aumenta as concentrações no sistema nervoso central (SNC) (PAN; TAKAHASHI, 2007). Somando-se a isso, outro estudo relata que o transporte de creatina através de transportadores específicos (CrT) localizados na barreira hemato-encefálica pode ser a principal fonte de fornecimento de creatina para o cérebro (OHTSUKI et al., 2002).

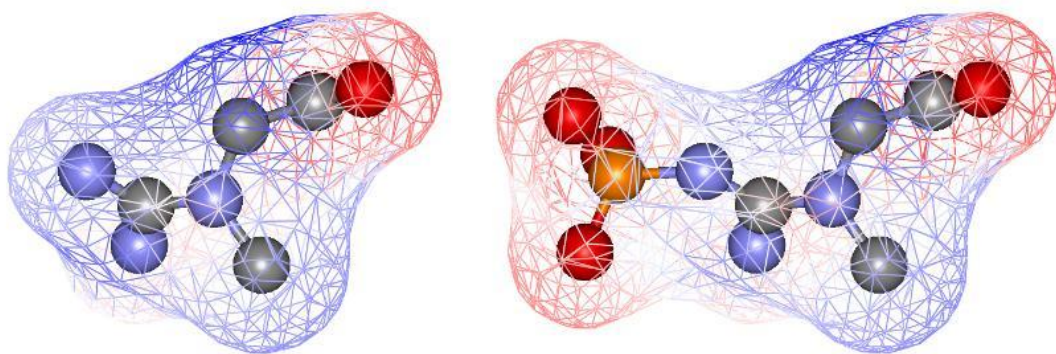


Figura 4: Estrutura tridimensional da creatina (esquerda) e da fosfocreatina (direita), com a polaridade das moléculas representadas (TOKARSKA-SCHLATTNER et al., 2012).

1.2.3 Transporte, Metabolismo e Farmacocinética

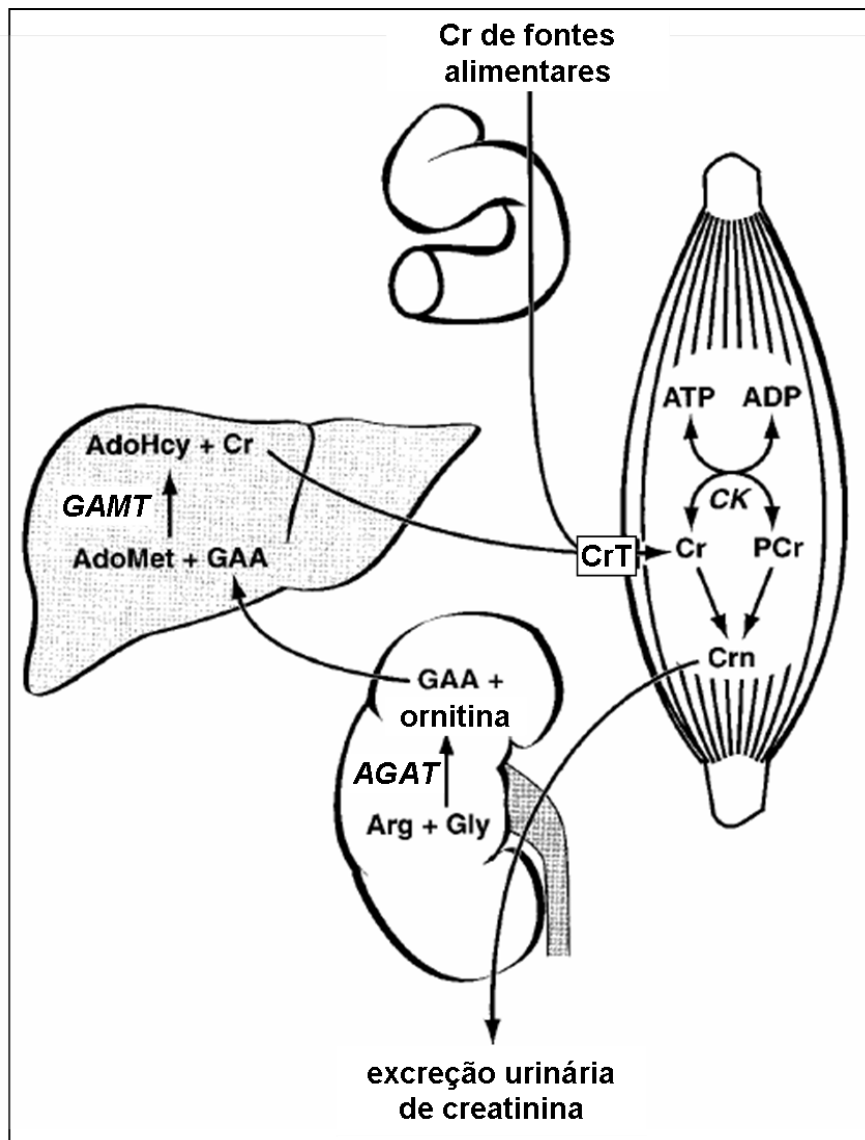


Figura 5. Representação esquemática do metabolismo da creatina dietética e endógena no corpo humano. Cr - creatina; PCr - fosfocreatina; CK - creatina quinase; GAMT - S-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metil transferase; AGAT - L-arginina:glicina amidino transferase; Crn - creatinina; GAA - guanidino 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).

A creatina ingerida é absorvida no intestino (Figura 5) e sua biodisponibilidade é alta, chegando a alcançar de 80 até aproximadamente 100%, dependendo da dose ingerida (quanto maior a dose, menor a proporção absorvida) (JAGER et al., 2007). As concentrações endógenas sanguíneas em

adultos saudáveis estão normalmente na faixa de 2-12 mg/L. Uma única dose oral de 5 g de creatina em adultos saudáveis resulta em um pico plasmático de aproximadamente 120 mg/L em 1 hora após a ingestão (PERSKY; BRAZEAU; HOCHHAUS, 2003). Uma vez na circulação, a creatina 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). O transportador de creatina segue a cinética de Michalis-Menten, obtendo um V_{max} em concentrações maiores que 0,4 mM (SORA et al., 1994). 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 da modulação do estado de fosforilação e/ou glicosilação destes transportadores (PERSKY; BRAZEAU, 2001).

Após o transporte para o meio intracelular a creatina pode ser armazenada sob as formas de creatina ou fosfocreatina, alcançando concentrações de até 30 μM (SCHLATTNER; TOKARSKA-SCHLATTNER; WALLIMANN, 2006). 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) (Figura 6). 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) (Figura 5). A excreção diária de creatina, sob a forma de creatinina é de aproximadamente 2 g, para um indivíduo do sexo masculino de 70 kg, sendo estes valores menores em mulheres, devido a menor massa muscular. Estes valores podem aumentar

em indivíduos com maior massa magra (BROSNAN; DA SILVA; BROSNAN, 2011).



Figura 6. Reação de transferência do fosfato γ do ATP para a Cr, formando ADP + PCr. Reação catalisada pela enzima creatina quinase. ATP - Trifosfato de Adenosina; ADP - Bifosfato de Adenosina; Cr - Creatina; PCr - Fosfocreatina.

1.2.4 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) (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000), e seu importante papel em nível mitocondrial, estabilizando a creatina quinase na sua forma octamérica (O'GORMAN et al., 1997), a creatina tem sido amplamente utilizada por atletas, na tentativa de melhorar o desempenho físico (WILLIAMS; BRANCH, 1998). Neste sentido, a creatina vem sendo alvo de diversos estudos, nos quais são testadas as possíveis ações terapêuticas frente a estudos clínicos e modelos experimentais de diversas doenças neurológicas (PRASS et al., 2007; SAKELLARIS et al., 2006; 2008; 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 (BURKLEN et al., 2006), Parkinson (BENDER et al., 2006; BENDER et al., 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), convulsões induzidas por metilmalonato (ROYES et al., 2003; ROYES et al., 2006) e ácido glutárico (MAGNI et al., 2007).

Além disso, a deficiência cerebral de creatina pode estar envolvida na patogênese de diversas outras doenças neurológicas. Essas doenças, relacionadas ao metabolismo da creatina, fazem parte de um grupo de erros inatos chamados de síndrome de deficiência de creatina. Estas síndromes podem ocorrer devido ao comprometimento da síntese endógena, ou seja, nas enzimas AGAT ou GAMT, ou ainda, devido a um déficit nos mecanismos de transporte de creatina (ANDRES et al., 2008). Dentre as diversas manifestações clínicas presentes nestes erros inatos, destaca-se a epilepsia (WYSS; SCHULZE, 2002). O fato de que a deficiência cerebral de creatina pode levar ao desenvolvimento da epilepsia é mais um indício para o envolvimento deste composto na manutenção e no controle da epileptogênese.

1.2.4.1 Creatina e Epilepsia

A respeito dos efeitos da creatina em modelos de convulsão e/ou epilepsia, os resultados são um tanto controversos. Neste sentido, Kim e colaboradores (2010) demonstraram que a creatina reduziu as convulsões agudas induzidas por pilocarpina, mas não teve efeito sobre as convulsões recorrentes (KIM et al., 2010). Por outro lado, Vielhaber e colaboradores (2003) mostraram que fatias do hipocampo de ratos epiléticos (induzido pelo modelo de pilocarpina) tratados com creatina apresentaram uma perda de neurônios piramidais mais pronunciada que o hipocampo dos animais epiléticos não tratados (VIELHABER et al., 2003). Estes resultados apresentam um efeito deletério da suplementação crônica com creatina. Em um modelo de *status epilepticus* induzido por kainato, Mikati et al. (2004) relataram que a suplementação com creatina não teve nenhum efeito neste modelo. Estes resultados mostram que a suplementação com creatina apresenta resultados muito conflitantes. O fator determinante para esta discrepância não é conhecido. Entretanto, tais resultados levam a crer que diferenças metodológicas podem contribuir para isto, tais como o agente convulsivante e/ou agente epileptogênico utilizado, as doses das drogas, os protocolos de suplementação, as vias de administração, espécies biológicas e os parâmetros

avaliados. Neste sentido, estudos que visem contribuir para um melhor entendimento e esclarecimento do papel da creatina nas crises epiléticas ou na epilepsia são necessários.

1.2.5 Ações independentes do metabolismo energético

Embora a maioria dos estudos atribua 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 proteica, por ser um agente osmolítico (PERSKY; BRAZEAU, 2001), uma vez que a hiperidratação celular age como um sinalizador anabólico e estimula a síntese proteica (HAUSSINGER; LANG; GEROK, 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 (ALFIERI et al., 2006). Neste contexto, tem sido relatado que a creatina pode ser um dos principais agentes osmolíticos do cérebro (BOTHWELL et al., 2001; BOTHWELL; STYLES; BHAKOO, 2002). Prass e colaboradores (2007) demonstraram também que a creatina previne contra o declínio do fluxo sanguíneo cerebral após um evento isquêmico, independentemente de alterações no *status* bioenergético do tecido cerebral (PRASS et al., 2007). Somando-se a isso, estudos têm relatado que a creatina pode ter ação antiapoptótica direta, por reduzir a permeabilidade dos poros de transição mitocondrial. Isto ocorre através da estabilização da enzima creatina quinase mitocondrial na conformação octamérica, estimulando assim a interação desta enzima com componentes dos poros de transição mitocondriais, no cérebro (O'GORMAN et al., 1997; DOLDER et al., 2003).

No Sistema Nervoso Central (SNC), Braissant e colaboradores (2001) demonstraram que a creatina pode ser sintetizada nos astrócitos e captada pelos neurônios (BRAISSANT et al., 2001). Complementando esta ideia, em

2006, Almeida e colaboradores apresentaram evidências de que a creatina pode ser liberada de maneira excitotóxica no SNC, dependente de potencial de ação, propondo uma possível ação neuromodulatória para este composto (ALMEIDA et al., 2006). De acordo com este ponto de vista, foi evidenciado que o tratamento de fatias hipocâmpais com creatina aumentou o número e a amplitude do *Population Spike* (população de espículas) na região *Cornu Ammonis 1* (CA1) deste tecido e, este efeito, foi revertido pelo co-tratamento com 2-amino-5-fosfopentanoato (AP-5), um antagonista de receptores do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (ROYES et al., 2008). Os mesmos autores também verificaram que o tratamento com creatina aumentou a ligação de [³H]MK-801, indicando que a creatina pode estar facilitando a transmissão sináptica por ativar receptores NMDA (ROYES et al., 2008). Além disso, Oliveira e colaboradores (2008) verificaram que a administração intrahipocâmpal de creatina resulta em melhora no aprendizado espacial, provavelmente por modular o sítio poliaminérgico nos receptores do subtipo NMDA. Somando-se a estes achados, Rambo e colaboradores (2012) propuseram que a creatina atua como um ativador da enzima Na⁺,K⁺-ATPase, através de uma via de sinalização ativada pelos receptores NMDA, sugerindo um envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito induzido pela creatina, sendo esta mais uma forte evidência para seu possível papel como modulador no SNC (RAMBO et al., 2012).

Ainda, em relação ao efeito da creatina no SNC, alguns estudos têm sugerido que o tratamento de culturas de neurônios estriatais com creatina aumenta a sobrevivência destas células e aumenta a densidade de neurônios GABAérgicos imunorreativos (ANDRES et al., 2005). Neste mesmo contexto, Ducray e colaboradores (2007a; 2007b) demonstraram que o tratamento com creatina estimula a diferenciação de neurônios GABAérgicos em cultura de neurônios da medula espinhal fetal de humanos e de ratos. Cabe salientar também que Koga e colaboradores (2005) inferiram, através de estudos comportamentais e farmacológicos, que a creatina pode ativar receptores GABA_A no cérebro. Estes achados corroboram a ideia de que a creatina pode exercer efeitos neuromodulatórios, entretanto, os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não estão completamente elucidados.

1.3 Exercício Físico

1.3.1 Histórico

A história do exercício físico pode, provavelmente, ser confundida com a história da humanidade. Para o homem primitivo a atividade física apresentava um caráter utilitário, uma vez que sua importância era evidenciada em atividades de sobrevivência, seja em situações de caça, onde necessitava obter alimento para sobreviver, ou em situações de fuga de predadores, em que a atividade física também se fazia necessária para a sobrevivência. Além disso, a atividade física também se manifestava em rituais, jogos e festividades (RAMOS, 1982).

Temas sobre exercício, desportos, jogos e saúde já preocupavam até mesmo as civilizações mais primitivas, como as culturas minoana e miceniana, os grandes impérios bíblicos de Davi e Salomão, Assíria, Babilônia, Média e Pérsia, assim como o império de Alexandre. Outras referências primitivas aos desportos, aos jogos e às práticas de saúde (higiene pessoal, exercício e treinamento) foram registradas nas antigas civilizações da Síria, Egito, Macedônia, Arábia, Mesopotâmia, Pérsia, Índia e China. Entretanto, a maior influência para a civilização ocidental veio dos médicos gregos da antiguidade - Herodico (500 a.C.), Hipócrates (460-377 a.C.) e Galeno (131-201 d.C.), que contribuíram com estudos anatômicos e fisiológicos (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003).

Na Grécia também nasceu o ideal da beleza humana, o qual pode ser observado nas obras de arte daquela época. Em Atenas, o exercício físico era praticado com o intuito de educação corporal, diferentemente de Esparta, onde o objetivo era a preparação para a guerra. A Grécia é considerada o berço dos Jogos Olímpicos, visto que lá foram disputados 293 vezes durante quase 12 séculos (776 a.C. - 393 d. C). Este fato demonstra a importância da atividade física nesta época. Em Roma, assim como em Esparta, o exercício físico objetivava principalmente a preparação militar. Além disso, havia, na Roma

antiga, atividades desportivas como as corridas de biga e os combates de gladiadores (RAMOS, 1982).

Na Idade Média os exercícios físicos foram a base da preparação militar dos soldados. Na Idade Moderna, diversos estudiosos contribuíram para a evolução do conhecimento dos exercícios físicos, com a publicação de obras relacionadas à fisiologia, anatomia, técnicas desportivas e pedagogia (RAMOS, 1982). Destacam-se nomes como Leonardo da Vinci, Michelangelo Buonarroti, Andreas Vesalius, entre outros, que contribuíram para a evolução científica dos conhecimentos relacionados às práticas de exercícios físicos (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003).

Atualmente, os conhecimentos científicos específicos relacionados às diferentes práticas e manifestações do exercício físico evoluem exponencialmente, desde níveis mais amplos, abrangendo técnicas desportivas e as especificidades dos treinamentos, até níveis específicos, possibilitando entender, inclusive em níveis moleculares, os efeitos da prática de exercícios físicos.

1.3.2 Exercício Físico e SNC

Os efeitos benéficos do exercício físico sobre a saúde em geral e a qualidade de vida são bem descritos, principalmente sobre o sistema cardiovascular e o metabolismo (POWELL; PAFFENBARGER, 1985; BOOTH; CHAKRAVARTHY; SPANGENBURG, 2002). Entretanto, somente nas últimas décadas os efeitos benéficos da atividade física sobre o SNC têm sido evidenciados (HILLMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008; VAN PRAAG, 2009). Estudos mostram que o exercício aumenta a capacidade de aprendizado, diminui o declínio cognitivo decorrente do envelhecimento, tem a capacidade de melhorar a memória, estimular a neurogênese hipocampal e modular a resposta neuroimunológica, além de proteger o SNC de insultos como o acidente vascular encefálico (JONES et al., 1999; KRAMER et al., 1999; COTMAN; BERCHTOLD, 2002; SPEISMAN et al., 2012). Além disso, o exercício físico se mostrou benéfico em uma série de modelos experimentais

de doenças neurológicas, como a epilepsia, esclerose múltipla, doenças de Huntington, Parkinson e Alzheimer, depressão e traumatismo crânio-encefálico (ARIDA et al., 1999; LAURIN et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; DISHMAN et al., 2006; KOHL et al., 2007; BENEDETTI et al., 2009; MOTA et al., 2012).

Alguns trabalhos têm se direcionado ao entendimento das bases neurobiológicas dos benefícios associados ao exercício físico. Sabe-se que o exercício físico sinaliza uma importante cascata responsável pela biogênese mitocondrial no cérebro, principalmente pela ativação do fator nuclear Pro- γ Co-ativador-1 α (PGC-1 α). A ativação da biogênese mitocondrial está envolvida na regulação de enzimas antioxidantes, uma vez que a PGC-1 α é necessária para a tradução da SOD, Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) (ST-PIERRE et al., 2006). Estudos em modelos animais mostram que a atividade física modula positivamente o sistema antioxidante, aumentando o conteúdo e/ou a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, tanto no músculo como no SNC (RADAK; CHUNG; GOTO, 2008; GOMES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2012).

Outro fator importante associado ao exercício físico é o aumento na expressão de fatores neurotróficos endógenos como o BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*) e NGF (Fator de Crescimento do Nervo, do inglês *Nerve Growth Factor*) (GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009). Além disso, o exercício físico aumenta não só a expressão destes fatores, mas também dos seus receptores específicos, como o TrkB (LIU et al., 2008). Estes fatores de crescimento neuronal, como o BDNF e o NGF, são de particular importância pela sua capacidade de promover a sobrevivência, diferenciação, neurogênese e boa função neuronal (KEMPERMANN; VAN PRAAG; GAGE, 2000).

1.3.3 Exercício Físico e Epilepsia

A proibição da prática de atividade física para pessoas com epilepsia é um mito que vem sendo transmitido ao longo do tempo sem argumentos convincentes. Embora existam raros casos de convulsões induzidas pela prática do exercício físico, o medo de que a atividade física precipite uma crise

é um dos principais fatores que levam as pessoas com epilepsia a evitarem essas práticas (ARIDA et al., 2003a). Na maioria dos casos isso acontece por falta de conhecimento ou ainda por informações equivocadas por parte de profissionais e familiares. O fato é que as pessoas com epilepsia devem praticar atividades físicas, pois os benefícios são inúmeros e vão muito além de simples melhoras nas capacidades físicas (ARIDA et al., 2010).

A maioria dos estudos têm geralmente mostrado que a atividade física pode diminuir a frequência de crises, bem como melhorar a eficiência cardiovascular e aspectos psicológicos associados a pessoas com epilepsia (HEISE et al., 2002; ARIDA et al., 2009). Em um estudo verificou-se que a atividade eletroencefalográfica epileptiforme interictal permanece inalterada ou tem sua frequência reduzida durante ou imediatamente após o exercício físico aeróbico (NAKKEN et al., 1997). Um estudo em mulheres com epilepsia refratária mostrou que o treinamento físico aeróbico diminuiu o número de crises durante o período de exercício (ERIKSEN et al., 1994). Além disso, Vancini e colaboradores (2010) importantemente relataram que uma sessão de exercício exaustivo agudo não induziu convulsões.

Estudos experimentais também têm demonstrado um efeito benéfico do exercício físico em modelos experimentais de convulsão e epilepsia, onde o treinamento físico retarda o desenvolvimento de convulsões induzidas por estimulação elétrica (ARIDA; DE JESUS VIEIRA; CAVALHEIRO, 1998), bem como reduz a frequência de crises espontâneas induzidas por pilocarpina (ARIDA et al., 1999). Também, estudos metabólicos, eletrofisiológicos e imunohistoquímicos corroboram os dados citados acima onde a atividade física apresenta efeitos benéficos em modelos experimentais de epilepsia (ARIDA et al., 2003b; ARIDA et al., 2007). Neste sentido, tanto o exercício voluntário quanto o forçado, em esteira ou de natação, reduziram as crises induzidas por ácido domóico, cainato e pilocarpina (CARROLL et al., 2001; SETKOWICZ; MAZUR, 2006; REISS et al., 2009). Estes achados claramente demonstram que o exercício físico pode influenciar positivamente o tratamento da epilepsia. Entretanto, pouco se sabe a respeito do envolvimento dos radicais livres no efeito protetor do exercício físico sobre a epilepsia. Desta maneira, a presente tese se justifica no intuito de investigar os mecanismos envolvidos no efeito protetor do treinamento físico em um modelo de convulsão induzida por PTZ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da presente tese consiste em investigar o efeito da administração de creatina (aguda e crônica) e de um programa de atividade física sobre as alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas induzidas pela administração de um agente convulsivante clássico (PTZ) em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados, os objetivos específicos serão divididos em: Artigo I e Artigo II.

2.2.1 Artigo I

- Verificar o efeito da suplementação oral crônica com creatina, de um programa de treinamento físico aeróbico e da combinação de ambos, sobre o nível de treinamento dos ratos;

- Verificar o efeito da suplementação oral crônica com creatina, de um programa de treinamento físico aeróbico e da combinação de ambos, sobre possíveis alterações comportamentais e eletroencefalográficas no modelo de convulsões induzidas por PTZ;

- Verificar o efeito da suplementação oral crônica com creatina, de um programa de treinamento físico aeróbico e da combinação de ambos, sobre as defesas antioxidantes e parâmetros de estresse oxidativo no modelo de convulsões induzidas por PTZ;

- Verificar o efeito da suplementação oral crônica com creatina, de um programa de treinamento físico aeróbico e da sua combinação, sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no modelo de convulsões induzidas por PTZ.

2.2.2 Artigo II

- Verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no modelo de convulsões induzidas por PTZ;

- Verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre possíveis alterações comportamentais e eletroencefalográficas no modelo de convulsões induzidas por PTZ;

- Verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre o metabolismo energético no modelo de convulsões induzidas por PTZ;

- Verificar o efeito da administração aguda de creatina sobre parâmetros oxidativos no modelo de convulsões induzidas por PTZ.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo I: Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures

3.1.1 Título em português

Efeitos anticonvulsivantes aditivos da suplementação com creatina e do exercício físico contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

3.1.2 Autores

Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Frederico Diniz Lima, Mauren Assis Souza, Luiz Fernando Almeida Silva, Leandro Thies Retamoso, Cristiane Lenz Dalla Corte, Gustavo Orione Puntel, Daiana Silva de Avila, Félix Alexandre Antunes Soares, Michele Rechia Fighera, Carlos Fernando Mello, Luiz Fernando Freire Royes.

3.1.3 Periódico e ano da publicação

Neurochemistry International, 2009.

3.1.4 Desenho experimental

Para uma melhor compreensão do artigo, acrescentou-se o desenho experimental do estudo, conforme segue:

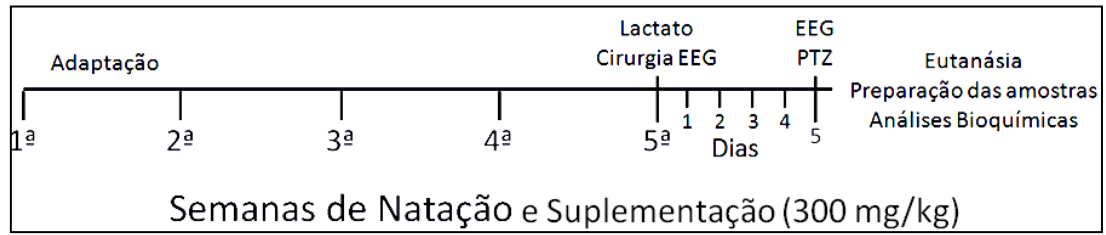
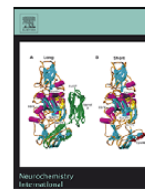


Figura 7: Desenho experimental do artigo 1



Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures

Leonardo Magno Rambo^{a,b}, Leandro Rodrigo Ribeiro^{a,b}, Mauro Schneider Oliveira^{a,c}, Ana Flávia Furian^{a,c}, Frederico Diniz Lima^{a,b}, Mauren Assis Souza^{a,b}, Luiz Fernando Almeida Silva^c, Leandro Thies Retamoso^c, Cristiane Lenz Dalla Corte^d, Gustavo Orione Puntel^d, Daiana Silva de Avila^d, Félix Alexandre Antunes Soares^d, Michele Rechia Fighera^e, Carlos Fernando Mello^a, Luiz Fernando Freire Royes^{a,b,*}

^a Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^e Universidade Luterana do Brasil, BR 287, Km 252, Trevo Maneco Pedroso – Boca do Monte, 97020-001 Santa Maria RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2009

Accepted 1 April 2009

Available online 22 April 2009

Keywords:

Seizure
Oxidative damage
Physical exercise
PTZ
Na⁺
K⁺-ATPase

ABSTRACT

Although physical activity and creatine supplementation have been a documented beneficial effect on neurological disorders, its implications for epilepsy are still controversial. Thus, we decided to investigate the effects of 6 weeks swimming training, creatine supplementation (300 mg/kg; p.o.) or its combination seizures and neurochemical alterations induced by pentylenetetrazol (PTZ). We found that 6 weeks of physical training or creatine supplementation decreased the duration of PTZ-induced seizures in adult male Wistar rats, as measured by cortical and hippocampal electroencephalography and behavioral analysis. Importantly, the combination between physical training and creatine supplementation had additive anticonvulsant effects, since it increased the onset latency for PTZ-induced seizures and was more effective in decrease seizure duration than physical training and creatine supplementation individually. Analysis of selected parameters of oxidative stress and antioxidant defenses in the hippocampus revealed that physical training, creatine supplementation or its combination abrogated the PTZ-elicited increase in levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and protein carbonylation, as well as decrease in non-protein-thiols content, catalase (CAT) and SOD activities. In addition, this protocol of physical training and creatine supplementation prevented the PTZ-induced decrease in hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity. Altogether, these results suggest that protection elicited physical training and creatine supplementation of selected targets for reactive species-mediated damage decrease of neuronal excitability and consequent oxidative damage elicited by PTZ. In conclusion, the present study shows that physical training, creatine supplementation or its combination attenuated PTZ-induced seizures and oxidative damage *in vivo*, and provide evidence that combination between creatine supplementation and physical exercise may be a useful strategy in the treatment of convulsive disorders.

Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Epilepsy is a common chronic neurological condition which constitute a large group of neurological diseases with an incidence of 0.5–1% in the general population (Andrade and Minassian, 2007).

While single-drug therapy provide optimal seizure control in about 80% of all patients, seizure activity remains uncontrolled in a significant number of individuals, even with the use of combination therapy (Dichter et al., 2007). Therefore, the search for alternative therapies for epilepsy deserves further investigation. In this context, physical exercise has emerged as a therapeutical aid and a protective factor in several neurological diseases, including epilepsy (Arida et al., 2004; Radak et al., 2007; Arida et al., 2009). In fact, it has been demonstrated that physical exercise have beneficial effects in animal models of epilepsy with predictive value for screening of anticonvulsant approaches, such as the amygdala electrical kindling

* Corresponding author at: Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: nandoroyes@yahoo.com.br (L.F.F. Royes).

model and the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (Arida et al., 1998, 1999a,b; Setkovicz and Mazur, 2006). Physical exercise increases the number of electrical stimulations necessary to reach the kindled state in the amygdala electrical kindling (Arida et al., 1998). Moreover, physical training decreases the susceptibility to subsequently evoked seizures and the frequency of spontaneous recurrent seizures in the pilocarpine model of epilepsy (Arida et al., 1999a; Setkovicz and Mazur, 2006). Altogether, these results suggest that regular physical training may be a useful adjuvant in the treatment of convulsive disorders.

Among the variety of physical exercises most used in researches involving animals, treadmill running and swimming stand out (Carvalho et al., 2005; Prada et al., 2004). Although there are still doubts in regarding which exercise (swimming or treadmill running) would be the most suitable to avoid unnecessary stress to the animals, the use of swimming rats as a model of exercise presents advantages since swimming is a natural ability of the rats. In this context, studies using swimming as an animal model of training revealed the occurrence of adaptation to physical training similar to those observed in human beings (Gobatto et al., 2001a; Voltarelli et al., 2002).

Creatine ($C_4H_9O_2N_3$; methyl-guanidine-acetic acid) is an endogenous guanidine compound which exogenous supplementation has been widely used as an ergogenic aid by athletes and also eventual practitioner of physical activity (Andres et al., 2008). Despite its use as an ergogenic aid, a large body of evidence has showed that creatine administration has neuroprotective and anticonvulsant properties in a variety of experimental models of neurological diseases, including seizure activity (Das et al., 2003; Royes et al., 2003; Andres et al., 2005; Magni et al., 2007; Bender et al., 2008). In addition, creatine and the more lipophilic derivatives creatine–Mg-complex (acetate) and phosphocreatine–Mg-complex (acetate) increased the latency to population spike disappearance during anoxia and anoxic depolarization and decreased anoxic “bursting” in hippocampal slices (Perasso et al., 2008). Such broad range of situations in which creatine supplementation has neuroprotective actions provides good reasons for the enthusiasm to establish creatine supplementation as an adjuvant or preventive therapy for a number of neurodegenerative human diseases (Andres et al., 2008). However, the effect of the combination between creatine and physical exercise in an experimental model of seizures was not studied to date. Given this premise, we hypothesized that combination between physical exercise and creatine supplementation has additive anticonvulsant effects against PTZ-induced seizures. In addition, since it has been proposed that at least part of the neuroprotective effects of physical training and/or creatine are due to antioxidant effects (Lawler et al., 2002; Ang and Gomez-Pinilla, 2007; Radak et al., 2008a,b; Guidi et al., 2008), and that it has been demonstrated that oxidative stress facilitates the appearance and/or propagation of seizures in several models of experimental epilepsy (Frantseva et al., 2000; Gluck et al., 2000; Gupta et al., 2003; Patsoukis et al., 2004), we evaluated the effect of the combination between physical exercise and creatine on PTZ-induced electrographic, oxidative and neurochemical alterations in the rat hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animal and reagents

In the present study we used adult male Wistar rats, weighing 250–300 g at the beginning and 400–450 g at the end of the experimental period. Animals were maintained in a controlled environment (12:12 h light–dark cycle, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. All experiments were conducted in conformance with the policy statement of the American College of Sports Medicine and Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as to minimize their suffering.

All the reagents used in the present study were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

2.2. Adaptation to the water

One week before the beginning of the experiment, all animals were adapted to the water. The adaptation procedure consisted of keeping the animals in shallow water (5 cm in depth) at 32°C between 9:00 and 11:00 a.m. The purpose of the adaptation was to reduce stress without promoting a physical training adaptation.

2.3. Creatine supplementation, training protocol and lactate threshold assay

In order to evaluate the combination between physical exercise and creatine on the electrographic, oxidative and neurochemical alterations in hippocampus of rats induced by systemic administration of subeffective or fully convulsant doses of PTZ animals were supplemented with creatine (300 mg/kg) (Magni et al., 2007) or its vehicle (0.1% carboxymethylcellulose) by intragastric gavage 45 min before every swimming training. The swimming training period lasted 5 weeks and consisted of 60-min daily sessions five times per week. Swimming was always performed in water at a temperature of 32°C between 9:00 and 11:00 a.m. During the first week of training, all animals underwent a swimming adaptation period without weights, as described above. After the swimming adaptation period, the rats were subjected to swimming training with working load (5% of body weight) for improvement of endurance exercise capacity (Gobatto et al., 2001a,b). At the same time of the training session, control rats were placed in a separate tank with shallow water (5 cm in depth) at 32°C , 5 days/week without the workload. Creatine supplementation, control and trained animals were randomly assigned in groups, as follows:

Experimental group	n
Vehicle/control rats	10
Vehicle/control rats/PTZ (30 mg/kg, i.p.)	8
Vehicle/control rats/PTZ (60 mg/kg, i.p.)	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/control rats	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/control rats/PTZ (30 mg/kg, i.p.)	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/control rats/PTZ (60 mg/kg, i.p.)	8
Vehicle/trained rats	8
Vehicle/trained rats/PTZ (30 mg/kg, i.p.)	8
Vehicle/trained rats/PTZ (60 mg/kg, i.p.)	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/trained rats	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/trained rats/PTZ (30 mg/kg, i.p.)	8
Creatine suppl. (300 mg/kg, p.o.)/trained rats/PTZ (60 mg/kg, i.p.)	8

On the first day after the fifth week of training, a standard test protocol was used to determine the lactate threshold (LT) in vehicle/control ($n = 6$), vehicle/trained ($n = 6$), creatine/control ($n = 6$), creatine/trained rats ($n = 6$). The LT test was carried out according to the protocol described by (Marquezi et al., 2003) and consisted of swimming exercises with progressive overload through weights attached to the animal's tail, corresponding to 4%, 5%, 6%, 7%, and 8% of the body weight of each animal for 3-min periods, separated by 1-min resting periods. During the resting periods, 25 μl blood samples were collected from the tail vein into heparinized capillary tubes for determination of lactate concentration (Voltarelli et al., 2002). The LT for each animal was calculated based on the point of inflection of the graph when plotting lactate concentration against the corresponding exercise workload.

2.4. Surgical procedures

For the electroencephalographical recordings, all animals were subjected to surgery 24 h after the last session of training. In brief, rats were deeply anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex (coordinates relative to bregma: AP –4.5 mm and L 2.5 mm), along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100 μm in diameter) were implanted 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (coordinates relative to bregma: AP 4 mm, ML 3 mm and V 2 mm) (Paxinos, 1986). All electrodes were connected to a multipin socket fixed to the skull with acrylic cement. All experiments were performed 5 days after surgery.

2.5. Seizure evaluation

Seizures were monitored in all animals by electroencephalographical recordings. At the day of the experiments, each animal was transferred to a Plexiglas cage (25 cm \times 25 cm \times 40 cm) and habituated for 20 min before EEG recording. The rat was then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage, and the EEG was recorded using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neurotec LTDA, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis.

Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After baseline recording, control and trained animals, supplemented or not with creatine, were injected with vehicle (0.1% carboxymethylcellulose) or PTZ (30 or 60 mg/kg, i.p.). The animals were observed for the appearance of generalized tonic–clonic convulsive episodes for 20 min according to (Ferraro et al., 1999), who describes generalized convulsive episodes as generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. PTZ-induced generalized convulsions typically lasted between 30 and 60 s, and were followed by a quiescent period. During the 20-min observation period, the latency for generalized tonic–clonic convulsions was measured. EEG recordings were visually analyzed for seizure activity, which were defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5\times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2\times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s, ≥ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2\times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2\times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2\times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s).

2.6. Tissue processing for neurochemical analyses

Immediately after the behavioral and electroencephalographical evaluation, animals were sacrificed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. Hippocampi were rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish. The right side was homogenized in cold 10 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) and used for determination of carbonyl content and Na^+, K^+ -ATPase activity. The left side was placed in ice-cold Krebs Cerebral Hensleit buffer containing 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 23 mM NaHCO_3 , 3 mM HEPES and 10 mM D -glucose equilibrated with 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 (pH 7.4) and hippocampal slices (0.4 mm) were obtained using a McIlwain tissue chopper. Slices were used for determination of non-protein-thiols and TBARS levels and superoxide dismutase and catalase activities.

2.7. Non-protein-thiols (NPS) levels

Levels of NPS in slice of hippocampus were determined according to Ellman and Lysko (1967), in the presence of 50 mM Tris–Cl, pH 7.4. Incubation at 37 °C was initiated by the addition of the thiol compounds. Aliquots of the reaction mixture (100 μl) were checked for the amount of –SH groups at 412 nm after 90–120 min of addition of color reagent 5'-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB).

2.8. Measurement of the protein carbonyl

Protein carbonyl content was determined by the colorimetric method described by Levine et al. (1990), adapted for brain tissue (Oliveira et al., 2004).

2.9. Measurement of TBARS content

TBARS assay, slices from hippocampus were homogenized in ultra-pure water and mixed with the TBA reagent (15% of trichloroacetic acid, 0.375% of thiobarbituric acid and 2.5% v/v of HCl). After 30 min of incubation, samples were centrifuged (3000 \times g, 15 min) and then TBARS levels were measured at 532 nm (Rios and Santamaria, 1991).

2.10. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity

In order to determine SOD and CAT activity, slices from hippocampus were homogenized in 40 volumes (w/v) with Tris–HCl 10 mM (pH 7.4) and enzyme activities were performed according to the methods of Misra and Fridovich (1972) and Aebi (1984), respectively. SOD activity was expressed as units/g of protein and CAT activity was expressed in units (1 U decomposes 1 μmol of H_2O_2 per minute at pH 7.0 at 25 °C).

2.11. Na^+, K^+ -ATPase activity measurements

Na^+, K^+ -ATPase activity measurements were performed in the same homogenate used for determination of the protein carbonyl content. The enzyme assay was performed according to Wyse et al. (2000).

2.12. Protein determination

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

2.13. Statistics analysis

Statistical analyses were carried out by one- or two-way analysis of variance (ANOVA). Values of F are only presented if $P < 0.05$. Post hoc analyses were carried out, when appropriate, by the Student–Newman–Keuls test. All data are expressed as mean \pm S.E.M.

3. Results

Fig. 1 shows the effect of physical training, creatine supplementation or its combination on lactate threshold and body weight. We found a clear stabilization of the blood lactate concentration in trained and trained/creatine supplemented rats when compared with control groups in the lactate threshold test [$F(3,19) = 6.39$; $P < 0.04$; Fig. 1A]. In addition, statistical analysis revealed a significant decrease in total body weight in trained versus control rats along the 6 weeks of swimming training [$F(3,19) = 15.19$; $P < 0.05$; Fig. 1B].

The effect of physical training, creatine supplementation or its combination on PTZ-induced electrographic alteration and convulsive behavior is shown in Fig. 2. As depicted in the representative EEG recordings, PTZ injection at a fully convulsant dose (60 mg/kg) caused the appearance of multispikes plus slow waves and major seizure activity characterized by the appearance of 2–3 Hz high-amplitude activity in the recording leads (Fig. 2A). In contrast, administration of subeffective doses of PTZ (30 mg/kg) induced the appearance of an EEG pattern characterized by multiple sharp waves in brief spindle episodes, which correlated with hypoactivity and tremor (Andre et al., 1998) (data not shown). In addition, statistical analyses revealed that physical training or creatine supplementation alone had no effect on the latency to PTZ-induced seizures (Fig. 2E). However, the combination between physical training and creatine supplementation significantly increased seizure latency by approximately 400% [$F(1,59) = 42.59$; $P < 0.05$; Fig. 2E], showing that this combination has additive anticonvulsant effects on PTZ-induced seizure latency. Conversely, physical training, creatine supplementation or its combination decreased the time spent in convulsions [$F(1,59) = 9.04$; $P < 0.05$; Fig. 2F]. In addition, post hoc analysis revealed that combination between physical training and creatine supplementation was more effective than exercise or creatine alone regarding the time spent in convulsions.

Considering that reactive species have been implicated in PTZ-induced convulsive behavior and that adaptive responses to physical training and creatine supplementation include an increase in antioxidant defenses and a decrease in radical leaking during oxidative phosphorylation (Lawler et al., 2002; Packer and Cadenas, 2007), several parameters that indicate the antioxidant status and oxidative stress levels were determined in the rat hippocampus.

The effect of physical training, creatine supplementation or its combination on PTZ-induced lipid peroxidation and protein carbonylation is shown in Fig. 3A and 3B. Statistical analysis showed that PTZ (60 mg/kg) elicited an increase in TBARS content in control rats [$F(1,96) = 3.45$; $P < 0.05$], and that physical training [$F(1,96) = 2.16$; $P < 0.05$] or creatine supplementation [$F(1,96) = 1.36$; $P < 0.05$] prevented such effect. In addition, the combination between creatine supplementation and physical training also decreased PTZ-induced increase TBARS content, being more effective than physical training alone [$F(1,96) = 1.24$; $P < 0.05$]. We also found that injection of PTZ (60 mg/kg) increased protein carbonylation levels in the hippocampus of control rats [$F(1,96) = 4.13$; $P < 0.01$; Fig. 3B], and that physical training [$F(1,96) = 1.09$; $P < 0.05$], creatine supplementation [$F(1,96) = 1.19$; $P < 0.05$] or its combination protected against such increase [$F(1,96) = 1.07$; $P < 0.05$; Fig. 3B].

Fig. 4A and B shows the effect of physical training and creatine supplementation on CAT and SOD activities, respectively. Statistical analysis showed that the injection of PTZ (60 mg/kg) induced a significant decrease in catalase activity [$F(1,96) = 8.08$; $P < 0.05$], and that physical training [$F(1,96) = 2.04$; $P < 0.05$], creatine supplementation [$F(1,96) = 5.15$; $P < 0.05$], or its combination protected against such decrease [$F(1,96) = 2.24$; $P < 0.05$; Fig. 4A].

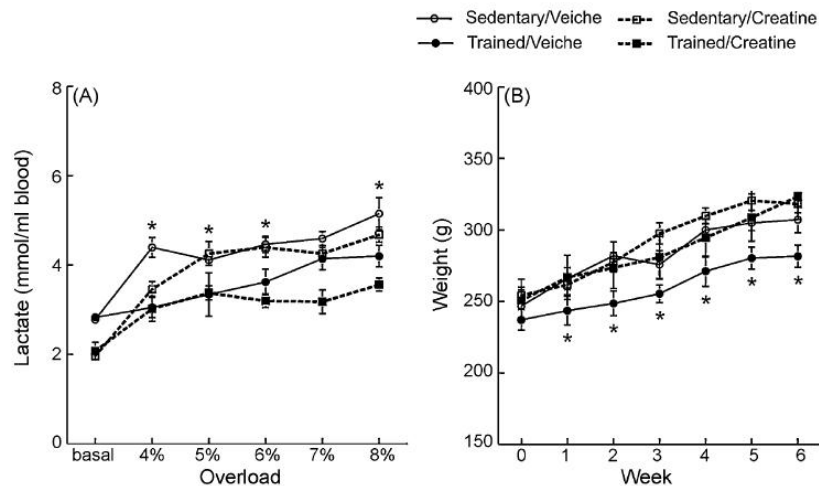


Fig. 1. Effect of creatine supplementation and swimming training on lactate threshold assay (A) and body weight (B). * $P < 0.05$ compared with control/vehicle group (F test for simple effect). Data mean + S.E.M. for $n = 6$ in each group.

In addition, creatine supplementation in control and trained rats blunted the decrease in SOD activity induced by administration of the fully convulsive dose of PTZ (60 mg/kg) [$F(1,96) = 3.81$; $P < 0.05$; Fig. 4B]. Interestingly, we found that physical training alone [$F(1,96) = 3.87$; $P < 0.05$] or in combination with creatine supplementation [$F(1,96) = 2.14$; $P < 0.05$] increased SOD activity when compared with control rats (Fig. 4B).

Considering that alterations in the redox state of regulatory sulfhydryl groups in selected targets, such as Na^+, K^+ -ATPase (Morel et al., 1998) increases cellular excitability and facilitates the appearance or propagation of convulsions (Ames, 2000), we investigated the effect physical training, creatine supplementation or its combination on NPS content and Na^+, K^+ -ATPase activity. Statistical analysis revealed that physical training [$F(1,96) = 13.37$;

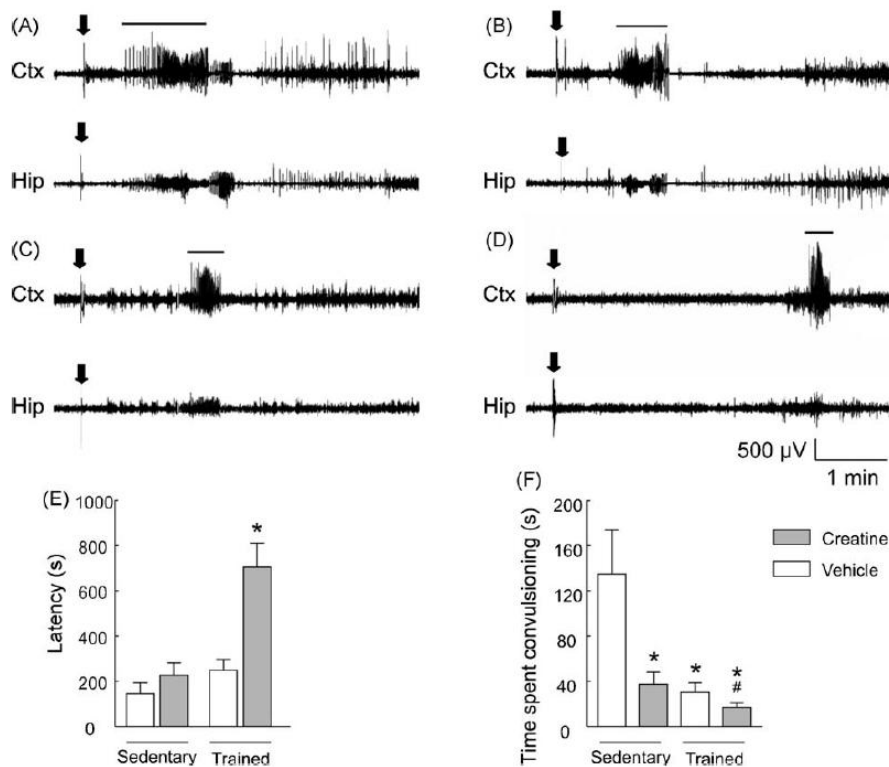


Fig. 2. Representative electroencephalographic recordings demonstrate the typical EEG recordings variations in hippocampus and cerebral cortex after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in control (A) and physical training group (B). EEG recording confirmed that either physical training (B) or creatine supplementation (C) or its combination (D) reduced of electrographical seizure activity. The arrow indicates PTZ (60 mg/kg, i.p.) administration. The top black bar indicates the EEG pattern associated with generalized tonic-clonic seizures. Calibration bars 500 μV and 1 min. (E and F) The effect of physical training and creatine supplementation on latency (E) and duration (F) of generalized tonic-clonic convulsions induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with control-PTZ group. # $P < 0.05$ compared to trained-PTZ group. Data mean + S.E.M. for $n = 8-10$ in each group.

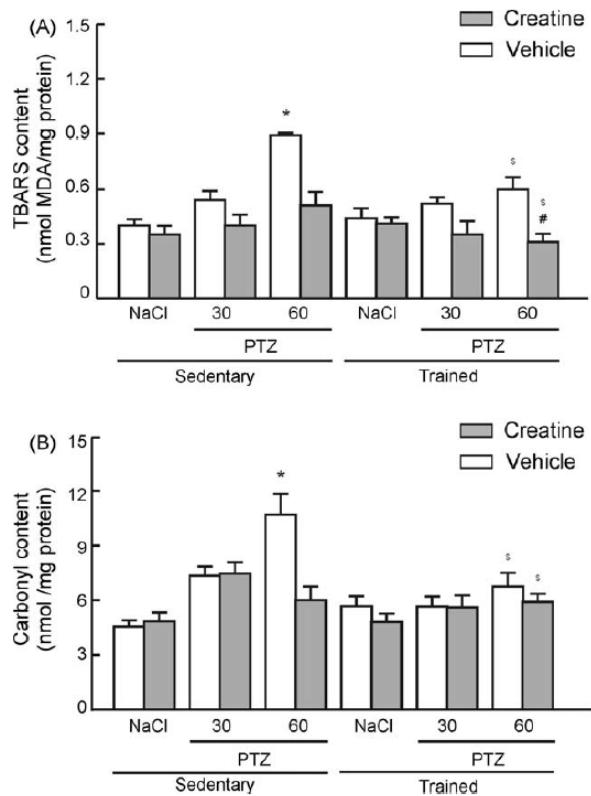


Fig. 3. Effect of swimming training and creatine supplementation on TBARS (A) and protein carbonyl (B) content after saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg; i.p.) or PTZ (30 and 60 mg/kg, i.p.) injection. * $P < 0.05$ compared with vehicle-control group. [§] $P < 0.05$ compared with control-PTZ group (60 mg/kg, i.p.). # $P < 0.05$ compared to trained-PTZ group (60 mg/kg, i.p.). Data mean + S.E.M. for $n = 8-10$ in each group.

$P < 0.05$], creatine supplementation [$F(1,96) = 10.00$; $P < 0.05$], or its combination [$F(1,96) = 9.10$; $P < 0.05$; Fig. 5A] increased NPS content *per se*. In addition, both physical training [$F(1,96) = 3.25$; $P < 0.05$], creatine supplementation [$F(1,96) = 2.05$; $P < 0.05$], or its combination [$F(1,96) = 2.17$; $P < 0.05$] protected against decrease in NPS content induced by PTZ (60 mg/kg). Statistical analysis also showed that administration of subeffective or fully convulsant doses of PTZ decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in the rat hippocampus [$F(2,96) = 8.08$; $P < 0.05$; Fig. 5B], and that physical training, creatine supplementation, or its combination blunted this effect.

4. Discussion

In the present study we showed that physical training, creatine supplementation, or its combination increased the onset latency and decreased the duration of PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures. Importantly, we found that the combination between physical training and creatine supplementation had additive anticonvulsant effects. Furthermore, physical training, creatine supplementation, or its combination abrogated PTZ-elicited increase in TBARS content and protein carbonylation levels, and decrease in NPS content CAT and SOD activities. In addition, physical training, creatine supplementation, or its combination blunted the PTZ-induced decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity.

In the last decade a growing number of studies have proposed that physical training or creatine supplementation may be useful adjuvant therapies in a variety of experimental models of neurological diseases, including seizure activity (Das et al.,

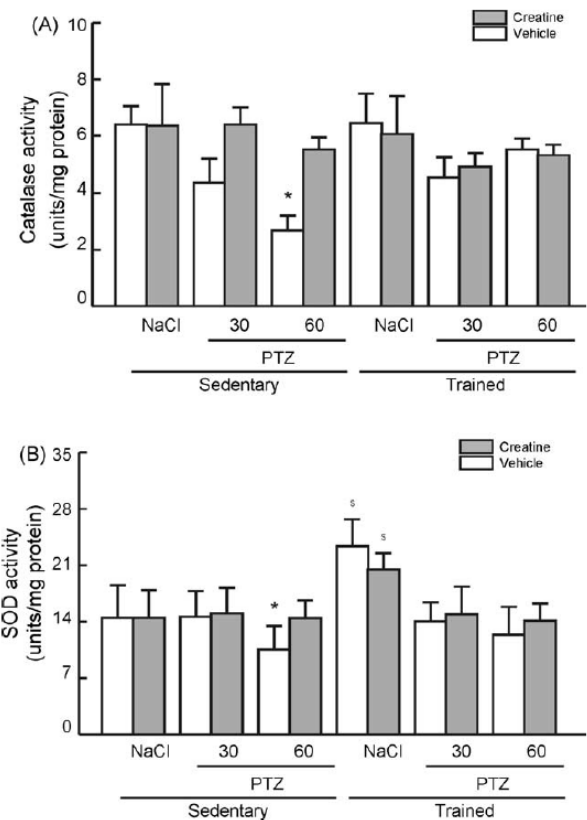


Fig. 4. Effect of physical training and creatine supplementation on catalase (CAT) (A) and superoxide dismutase (SOD) (B) activity after saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.) or PTZ (30 and 60 mg/kg, i.p.) injection. Data are mean + S.E.M. for $n = 8-10$ in each group. * $P < 0.05$ compared to vehicle-control group. [§] $P < 0.05$ compared with creatine-PTZ group (60 mg/kg, i.p.). Data mean + S.E.M. for $n = 8-10$ in each group.

2003; Royes et al., 2003; Andres et al., 2005; Magni et al., 2007; Bender et al., 2008; Souza et al., 2009; Arida et al., 2009). Nevertheless, the effect of the combination between physical exercise and creatine supplementation on seizure activity has not been evaluated to date. Therefore, the currently reported additive anticonvulsant effects of physical training and creatine supplementation on seizure activity induced by PTZ are of particular interest because support the idea that this combination may constitute a more effective approach as adjuvant aid in the treatment of convulsive disorders. Moreover, while physical exercise has potential as adjuvant therapy for seizure control, it is interesting to point out that the well-known positive effects of low level of physical activity on quality of life may constitute an additional attractive. In this context, concerns about increased seizure frequency and the potential for injury have led a significant number of patients with epilepsy believe that physical exercise increases likelihood of a seizure (Steinhoff et al., 1996). This is likely the reason that epileptic patients lead control lives with a greater body weight, significant poorer muscle strength and respiratory capacity than people taking part in exercises from time to time (Jalava and Sillanpaa, 1997).

Though treadmill running is mentioned as the most used exercise type in experiments with animals (Daggan et al., 2000; Bennell et al., 2002; Carvalho et al., 2005), the use of swimming rats physical exercise model presents advantages over treadmill running. For instance, swimming is a natural ability of the rat, and this avoids the selection of the animals, which is necessary in experimental protocols using treadmill running (Arida et al., 1999a). Moreover, the difficulty for velocity maintenance and

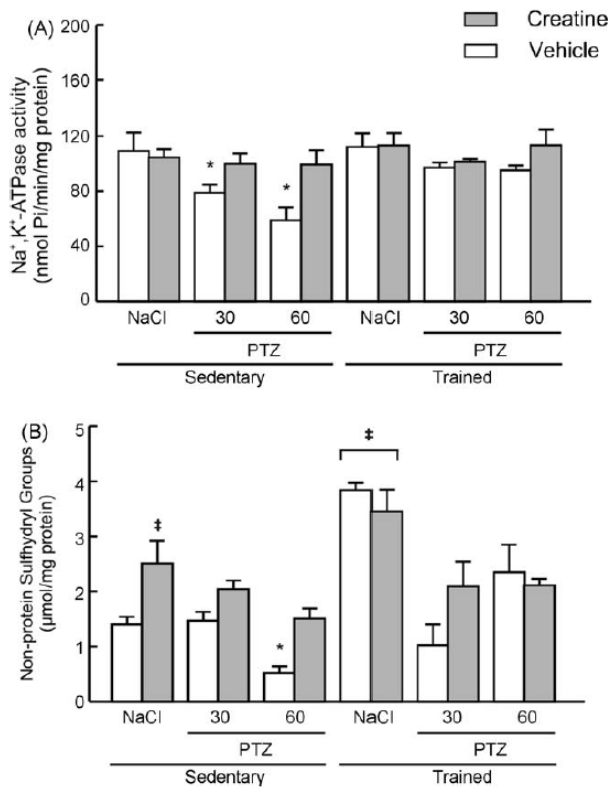


Fig. 5. Effect of physical training and creatine supplementation on Na⁺,K⁺-ATPase activity (A) and non-protein sulfhydryl groups (NPS) (B) after saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.) or PTZ (30 and 60 mg/kg, i.p.) injection. Data are mean ± S.E.M. for *n* = 8–10 in each group. **P* < 0.05 compared to vehicle-control group. †*P* < 0.05 compared with creatine-PTZ group (30 and 60 mg/kg, i.p.). Data mean ± S.E.M. for *n* = 8–10 in each group.

presence of electric stimulus as stress factor are additional pitfalls of the treadmill running (Gobatto et al., 2001a). Despite such methodological differences, both swimming and treadmill running seems to be good models for investigate the effects of physical training on laboratory animals. In this context, we found a clear stabilization of the blood lactate concentration in trained versus control rats in the lactate threshold test. Since previous studies have suggested that stabilization of blood lactate in trained animals is due to muscle aerobic adaptations leading to lower lactate production and/or increased blood lactate removal for the same relative and absolute workload (Jones and Carter, 2000; Gladden, 2000; Donovan and Pagliassotti, 2000), our results are in agreement with the idea that swimming training is an effective protocol to induce muscle aerobic adaptations in rats, similar to those observed in human beings (Gobatto et al., 2001a; Voltarelli et al., 2002).

In apparent contrast to our results, Mikati et al. (2004) found that creatine supplementation did not prevent kainate-induced spontaneous recurrent seizures, increased aggressivity on the handling test and hippocampal histologic injury, suggesting that creatine-elicited anticonvulsant effects may differ depending on convulsant agent, doses, administration routes, animal species and parameters evaluated. For instance, in the present study, creatine supplementation had no effect on the onset latency, but decreased the time spent in for PTZ-induced seizures. Therefore, further studies are necessary to determine the specific types of seizures in which creatine supplementation and physical training could be an improved therapeutic measure.

Regarding the mechanisms underlying the presently reported anticonvulsant effects of physical exercise, creatine supplementa-

tion or its combination, our results suggest it may involve antioxidant mechanisms, since it has been demonstrated that oxidative stress facilitates the appearance and/or propagation of seizures in several models of experimental epilepsy (Frantseva et al., 2000; Gluck et al., 2000; Gupta et al., 2003; Patsoukis et al., 2004, 2005; Oliveira et al., 2004; Ribeiro et al., 2005; Figuera et al., 2006). Accordingly, we showed that physical training and creatine supplementation increased the NPS content and SOD activity *per se*, and were effective against Na⁺,K⁺-ATPase inhibition elicited by increasing doses of PTZ (Souza et al., 2009). In addition, combination between physical training and creatine supplementation abrogated PTZ-induced increase in TBARS and protein carbonyl levels, decrease in NPS content and CAT and SOD activities. In line with this view, it has been demonstrated that creatine supplementation and regular exercise lead to the development of compensatory responses to oxidative stress (Salo et al., 1991; Viguie et al., 1993; Leeuwenburgh and Heinecke, 2001; Lawler et al., 2002; Royes et al., 2006). In fact, previous studies that have demonstrated a significant selectivity regulation of antioxidant enzymes activity induced by physical exercise (Radak et al., 2007) and direct scavenging of ROS generation elicited by creatine (Sestili et al., 2006). In line of this view, a considerable body of evidence has suggested that exercise-induced production of ROS plays a role in the induction of antioxidants, DNA repair and protein degrading enzymes, resulting in decreased incidence of oxidative stress (Navarro et al., 2004; Radak et al., 2006; Boveris and Navarro, 2008). Additionally, experimental findings have demonstrated that creatine provides selective antioxidant role by prevent the opening of the mitochondria permeability transition pore, which ultimately increases Ca²⁺ and ROS intramitochondrial levels and causes excitotoxic and apoptotic cell death in several neurodegenerative (O'Gorman et al., 1997; Leist and Nicotera, 1998; Brewer and Wallimann, 2000; Sakellaris et al., 2006).

Since there are evidence that some selected targets for oxidative stress, such as Na⁺,K⁺-ATPase might lead to enhance of neuronal excitability and appearance of convulsions, the currently reported PTZ-induced increase in TBARS and protein carbonyl content, as well as decrease in NPS content and CAT and SOD activities may be interpreted either as responsible for decrease in Na⁺,K⁺-ATPase as well as a consequence of the decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity and/or simultaneous events that synergically contribute to the neuronal excitability elicited by this convulsant agent. However, we cannot rule out other mechanisms which might be used to explain the currently reported anticonvulsant effects of physical training and/or creatine supplementation. For instance, the neuroprotective effect exerted by creatine in several neurodegenerative processes involves buffering of intracellular energy, preventing the increase of Ca²⁺ and ROS intramitochondrial levels which leads to excitotoxic cell death (O'Gorman et al., 1997; Leist and Nicotera, 1998; Dolder et al., 2003; Klivenyi et al., 2003, 2004; Andres et al., 2005). Moreover, in light of the role of steroid hormones in the correlation of physical exercise and convulsive activity, it has been demonstrated that the 3 α -reduced metabolites of testosterone (5 α -dihydrotestosterone and 3 α -androstenediol) had powerful protective activity against seizures induced by several GABA_A receptor antagonists, pilocarpine and maximal electroshock model (Kaminski et al., 2004; Reddy and Rogawski, 2002). In intravenous PTZ test, the 3 α -androstenediol and 5 α -androstenediol cause a dose-dependent elevation of seizure threshold (Reddy, 2004) suggesting that anticonvulsant effect exerted by these metabolites correspond to its ability to potentates the GABA_A receptor-mediated inhibition (Reddy, 2008). In addition, since it has been shown that physical training upregulates the glutamate transporter EAAT-1 in the rodent brain (Molteni et al., 2002), and that increased expression of this excitatory aminoacid carrier is a critical phenomenon underlying

the anticonvulsant effects of the broad spectrum antiepileptic drug valproic acid (Aguirre et al., 2008), it is plausible that exercise-induced upregulation of EAAT-1 be involved in its anticonvulsant effects.

One last point to comment is that our protocol of swimming training decreased total body weight in trained versus control rats along the 6 weeks of training. Regarding such difference in body weight between control and trained rats, we think that it may be explained by changes in body composition. For instance, a decrease in subcutaneous adipose tissue of trained rats may explain why body mass was smaller in this group (Petridou et al., 2005). However, we have not determined body composition in the present study, and therefore this explanation remains speculative in nature, and further studies are necessary to determine the mechanisms involved.

In conclusion, the present study showed that physical training, creatine supplementation or its combination attenuated PTZ-induced seizures and oxidative damage *in vivo*. Importantly, physical training and creatine supplementation combination had additive anticonvulsant effects. Our data provide evidence about the anticonvulsant and antioxidant potential of the combination between creatine supplementation and physical exercise.

Acknowledgements

Work supported by FINEP (grant: 01.06.0842-00) and CNPq (grant: 500120/2003-0). C.F. Mello and A.F. Furian are the recipients of CNPq fellowships. L.M. Rambo, M.A. Souza and M.S. Oliveira are the recipients of a CAPES fellowships. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. In addition, we would like to state that all authors have seen and approved the study and that no part of the work has been published or is under consideration for publication elsewhere. Moreover, the present study was supported by government funding and has no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest. We also would like to declare that all experiments were carried out according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, and that the University Ethics Committee approved the respective protocols.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aguirre, G., Rosas, S., López-Bayghen, E., Ortega, A., 2008. Valproate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1 expression: involvement of Ying-Yang 1. *Neurochem. Int.* 52, 1322–1331.
- Ames 3rd, A., 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34, 42–68.
- Andrade, D.M., Minassian, B.A., 2007. Genetics of epilepsies. *Expert Rev. Neurotherapeut.* 7, 727–734.
- Andre, V., Pineau, N., Motte, J.E., Marescaux, C., Nehlig, A., 1998. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2094–2106.
- Andres, R.H., Ducray, A.D., Perez-Bouza, A., Schlattner, U., Huber, A.W., Krebs, S.H., Seiler, R.W., Wallimann, T., Widmer, H.R., 2005. Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP+ toxicity in an organotypic tissue culture system. *Cell Transplant.* 14, 537–550.
- Andres, R.H., Ducray, A.D., Schlattner, U., Wallimann, T., Widmer, H.R., 2008. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 76, 329–343.
- Ang, E.T., Gomez-Pinilla, F., 2007. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr. Med. Chem.* 14, 2564–2571.
- Arida, R.M., de Jesus Vieira, A., Cavalheiro, E.A., 1998. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res.* 30, 127–132.
- Arida, R.M., Sanabria, E.R., da Silva, A.C., Faria, L.C., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., 2004. Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Physiol. Behav.* 83, 165–171.
- Arida, R.M., Scorza, F.A., dos Santos, N.F., Peres, C.A., Cavalheiro, E.A., 1999a. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res.* 37, 45–52.
- Arida, R.M., Scorza, F.A., Peres, C.A., Cavalheiro, E.A., 1999b. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 34, 99–107.
- Arida, R.M., Scorza, F.A., Scorza, C.A., Cavalheiro, E.A., 2009. Is physical activity beneficial for recovery in temporal lobe epilepsy? Evidences from animal studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33 (3), 422–431.
- Bender, A., Beckers, J., Schneider, I., Holter, S.M., Haack, T., Ruthsatz, T., Vogt-Weisenhorn, D.M., Becker, L., Genius, J., Rujescu, D., Irmeler, M., Mijalski, T., Mader, M., Quintanilla-Martinez, L., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M.H., Wurst, W., Schmidt, J., Klopstock, T., 2008. Creatine improves health and survival of mice. *Neurobiol. Aging* 29, 1404–1411.
- Bennell, K.L., Khan, K.M., Warmington, S., Forwood, M.R., Coleman, B.D., Bennett, M.B., Wark, J.D., 2002. Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 1958–1965.
- Boveris, A., Navarro, A., 2008. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 224–229.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Brewer, G.J., Wallimann, T.W., 2000. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 74, 1968–1978.
- Carvalho, J.F., Masuda, M.O., Pompeu, F.A.M., 2005. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol. A* 140, 409–413.
- Daggan, R.N., Zafeiridis, A., Dipla, K., Puglia, C.D., Gratz, I., Catalano, E., Kendrick, C.V., 2000. The effects of chronic exercise on anesthesia induced hepatotoxicity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 2024–2028.
- Das, A.M., Lucke, T., Ullrich, K., 2003. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol. Genet. Metab.* 78, 108–111.
- Dichter, M.A., Hauser, W.A., Vinters, H.V., Pedley, T.A., 2007. Epidemiology, Pathology and Genetics of Epilepsy. In: Engel, J., Pedley, T.A., Aicardi, J., Dichter, M.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, 2nd Ed., Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 9–211.
- Dolder, M., Walzel, B., Speer, O., Schlattner, U., Wallimann, T., 2003. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J. Biol. Chem.* 278, 17760–17766.
- Donovan, M., Pagliassotti, M.J., 2000. Quantitative assessment of pathways for lactate disposal in skeletal muscle fiber types. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 772–777.
- Ellman, G.L., Lysko, H., 1967. Disulfide and sulfhydryl compounds in TCA extracts of human blood and plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 518–527.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., St Jean, P., Schork, N.J., Mulholland, N., Ballas, C., Schill, J., Buono, R.J., Berrettini, W.H., 1999. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J. Neurosci.* 19, 6733–6739.
- Figuera, 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., 2006. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol. Dis.* 22, 611–623.
- Frantseva, M.V., Perez Velazquez, J.L., Tsoraklidis, G., Mendonca, A.J., Adamchik, Y., Mills, L.R., Carlen, P.L., Burnham, M.W., 2000. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience* 97, 431–435.
- Gladden, L.B., 2000. Muscle as a consumer of lactate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 764–771.
- Gluck, M.R., Jayatileke, E., Shaw, S., Rowan, A.J., Haroutunian, V., 2000. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res.* 39, 63–71.
- Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001a. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 130, 21–27.
- Gobatto, C.A., Sibuya, C.Y., Kokubun, E., Luciano, E., Azevedo, J.M.R., Mello, M.A.R., 2001b. Caracterização da Intensidade de Exercício e do Efeito do Treinamento Físico no Modelo de Natação de Ratos Wistar. *Motriz* 7, S57–S62.
- Guidi, C., Potenza, L., Sestili, P., Martinelli, C., Guescini, M., Stocchi, L., Zeppa, S., Polidori, E., Annibalin, G., Stocchi, V., 2008. Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and nuclear DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 16–26.
- Gupta, Y.K., Veerendra Kumar, M.H., Srivastava, A.K., 2003. Effect of Centella asiatica on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 579–585.
- Jalava, M., Sillanpaa, M., 1997. Physical activity, health-related fitness, and health experience in adults with childhood-onset epilepsy: a controlled study. *Epilepsia* 38, 424–429.
- Jones, M., Carter, H., 2000. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Med.* 29, 373–376.
- Kaminski, R.M., Livingood, M.R., Rogawski, M.A., 2004. Allopregnanolone analogs that positively modulate GABA receptors protect against partial seizures induced by 6-Hz electrical stimulation in mice. *Epilepsia* 45, 864–867.
- Klivenyi, P., Calingasan, N.Y., Starkov, A., Stavrovskaya, I.G., Kristal, B.S., Yang, L., Wieringa, B., Beal, M.F., 2004. Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. *Neurobiol. Dis.* 15, 610–617.
- Klivenyi, P., Gardian, G., Calingasan, N.Y., Yang, L., Beal, M.F., 2003. Additive neuroprotective effects of creatine and a cyclooxygenase 2 inhibitor against dopamine depletion in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 21, 191–198.

- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., Demaree, S., 2002. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 47–52.
- Leeuwenburgh, C., Heinecke, J.W., 2001. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr. Med. Chem.* 8, 829–838.
- Leist, M., Nicotera, P., 1998. Calcium and neuronal death. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 132, 79–125.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, L., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Magni, D.V., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Fiorenza, N.G., Figuera, M.R., Ferreira, J., Mello, C.F., Royes, L.F., 2007. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res.* 1185, 336–345.
- Marquezi, M.L., Roschel, H.A., dos Santa Costa, A., Sawada, L.A., Lancha Jr., A.H., 2003. Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 13, 65–75.
- McColl, C.D., Horne, M.K., Finkelstein, D.I., Wong, J.Y., Berkovic, S.F., Drago, J., 2003. Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44, 234–243.
- Mikati, M.A., Kurdit, R.M., Rahmeh, A.A., Farhat, F., Abu Rialy, S., Lteif, L., Francis, E., Geha, G., Maraashli, W., 2004. Effects of creatine and cyclocreatine supplementation on kainate induced injury in pre-pubescent rats. *Brain Injury* 18, 1229–1241.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247, 6960–6962.
- Molteni, R., Ying, Z., Gómez-Pinilla, F., 2002. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1107–1116.
- Morel, P., Fauconneau, B., Page, G., Mirbeau, T., Hugué, F., 1998. Inhibitory effects of ascorbic acid on dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: relationship to lipid peroxidation and oxidation of protein sulfhydryl groups. *Neurosci. Res.* 32 (2), 171–179.
- Navarro, A., Gómez, C., Lopez-Cepero, J.M., Boveris, A., 2004. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am. J. Physiol. Regulat. Integr. Comp. Physiol.* 286, R505–511.
- O’Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A.P., Brdiczka, D., Wallimann, T., 1997. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 414, 253–257.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F.F., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Fiorenza, N.G., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Packer, L., Cadenas, E., 2007. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic. Res.* 41, 951–952.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., Panagopoulos, N.T., 2004. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 62, 65–74.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., Panagopoulos, N.T., 2005. Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Epilepsia* 46, 1205–1211.
- Paxinos, G., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, San Diego.
- Perasso, L., Lunardi, G.L., Rizzo, F., Pohvozcheva, A.V., Leko, M.V., Gandolfo, C., Florio, T., Cupello, A., Burov, S.V., Balestrino, M., 2008. Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem. Res.* 33, 765–775.
- Petridou, A., Nikolaidis, M.G., Matsakas, A., Schulz, T., Michna, H., Mougios, V., 2005. Effect of exercise training on the fatty acid composition of lipid classes in rat liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *Eur. J. Appl. Physiol.* 94 (1–2), 84–92.
- Prada, F.J.A., Voltarelli, F.A., De Oliveira, C.A., Gobatto, C.A., de Mello, M.A., 2004. Condicionamento anaeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *Revista Brasileira de Ciência & Movimento* 12, 29–34.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Goto, S., 2008a. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 153–159.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., Goto, S., 2008b. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7, 34–42.
- Radak, Z., Kumagai, S., Taylor, A.W., Naito, H., Goto, S., 2007. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 942–946.
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* 49, 387–392.
- Reddy, D.S., 2004. Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstanediol and 17beta-estradiol. *Neuroscience* 129, 195–207.
- Reddy, D.S., 2008. Mass spectrometric assay and physiological-pharmacological activity of androgenic neurosteroids. *Neurochem. Int.* 52, 541–553.
- Reddy, D.S., Rogawski, M.A., 2002. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 22, 3795–3805.
- Ribeiro, M.C., de Avila, D.S., Schneider, C.Y., Hermes, F.S., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Rubin, M.A., Lehmann, M., Krieglstein, J., Mello, C.F., 2005. Alpha-tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 66, 185–194.
- Rios, C., Santamaria, A., 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16, 1139–1143.
- Royes, L.F., Figuera, 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., 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118, 1079–1090.
- Royes, L.F., Figuera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Myskiw, J., de, C., Fiorenza, N.G., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 136–144.
- Sakellaris, G., Kotsiou, M., Tamiolaki, M., Kalostos, G., Tsapaki, E., Spanaki, M., Spilioti, M., Charissis, G., Evangelidou, A., 2006. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. *J. Trauma* 61, 322–329.
- Salo, D.C., Donovan, C.M., Davies, K.J., 1991. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 239–246.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Giocchini, A.M., Stocchi, V., 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 837–849.
- Setkowicz, Z., Mazur, A., 2006. Physical training decreases susceptibility to subsequent pilocarpine-induced seizures in the rat. *Epilepsy Res.* 71, 142–148.
- Souza, M.A., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Corte, L.C., Silva, L.F., Retamoso, L.T., Corte, C.L., Puntel, G.O., de Avila, D.S., Soares, F.A., Figuera, M.R., de Mello, C.F., Royes, L.F., 2009. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na, K-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50, 811–823.
- Steinhoff, B.J., Neuss, K., Thegeder, H., Reimers, C.D., 1996. Leisure time activity and physical fitness in patients with epilepsy. *Epilepsia* 37, 1221–1227.
- Viguie, C.A., Frei, B., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., Packer, L., Brooks, G.A., 1993. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol.* 75, 566–572.
- Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., de Mello, M.A., 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (11), 1389–1394.
- Wyse, A.T., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.I., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11, 2331–2334.

3.2 Artigo II: Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylentetrazol-induced seizures

3.2.1 Título em português

Administração aguda de creatina melhora o potencial de membrana mitocondrial e protege contra as convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

3.2.2 Autores

Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Iuri Domingues Della-Pace, Daniel Neis Stamm, Rogério da Rosa Gerbatin, Marina Prigol, Simone Pinton, Cristina Wayne Nogueira, Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Michele Rechia Figuera, Luiz Fernando Freire Royes.

3.2.3 Periódico e ano da publicação

Amino Acids, 2012.

3.2.4 Desenho Experimental

Para uma melhor compreensão do artigo, acrescentou-se o desenho experimental do estudo, conforme segue:

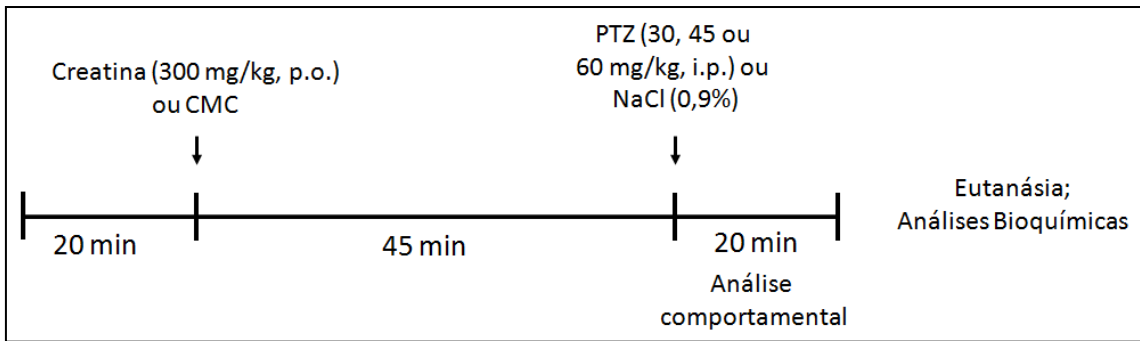


Figura 8: Desenho experimental do artigo II - Análises comportamentais e bioquímicas.

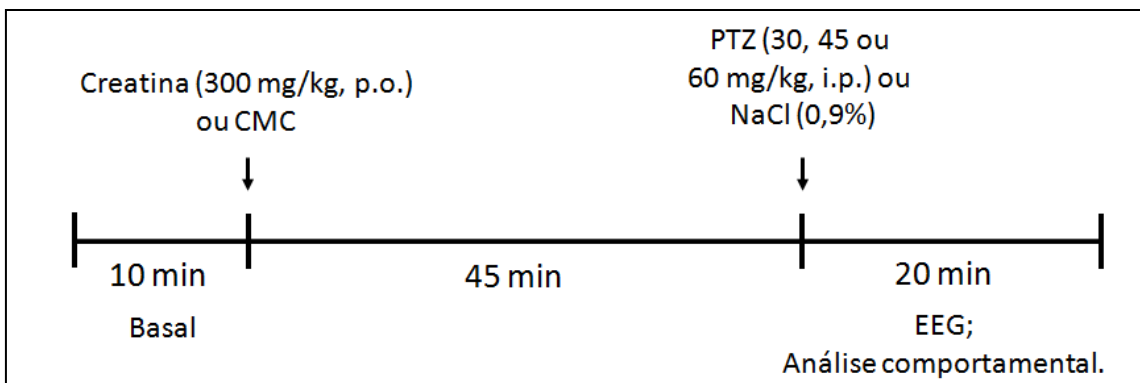


Figura 9: Desenho experimental do artigo II - Análises comportamentais e eletroencefalográficas.

Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylenetetrazol-induced seizures

Leonardo Magno Rambo · Leandro Rodrigo Ribeiro · Iuri Domingues Della-Pace · Daniel Neis Stamm · Rogério da Rosa Gerbatin · Marina Prigol · Simone Pinton · Cristina Wayne Nogueira · Ana Flávia Furian · Mauro Schneider Oliveira · Michele Rechia Fighera · Luiz Fernando Freire Royes

Received: 3 March 2012 / Accepted: 24 September 2012
© Springer-Verlag Wien 2012

Abstract A growing body of evidence indicates that creatine (Cr) exerts beneficial effects on a variety of pathologies where energy metabolism and oxidative stress play an etiological role. However, the benefits of Cr treatment for epileptics are still shrouded in controversy. In the present study, we found that acute Cr treatment (300 mg/kg, p.o.) prevented the increase in electroencephalographic wave amplitude typically elicited by PTZ (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Cr treatment also increased the latency periods of first myoclonic jerks, lengthened the latency periods of the generalized tonic–clonic seizures and

reduced the time spent in the generalized tonic–clonic seizures induced by PTZ (60 mg/kg). Administration of PTZ (all doses) decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity as well as adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate levels in the cerebral cortex, but Cr treatment prevented these effects. Cr administration also prevented increases in xanthine oxidase activity, adenosine monophosphate levels, adenosine levels, inosine levels and uric acid levels that normally occur after PTZ treatment (60 mg/kg, i.p.). We also showed that Cr treatment increased the total Cr (Cr + PCr) content, creatine kinase activity and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) in the cerebral cortex. In addition, Cr prevented PTZ-induced mitochondrial dysfunction characterized by decreasing $\Delta\Psi$, increasing thiobarbituric acid-reactive substance levels and increasing protein carbonylation. These experimental findings reinforce the idea that mitochondrial dysfunction plays a critical role in models of epileptic seizures and suggest that buffering brain energy levels through Cr treatment may be a promising therapeutic approach for the treatment of this neurological disease.

L. M. Rambo · L. R. Ribeiro · M. Prigol · S. Pinton · C. W. Nogueira · M. S. Oliveira · M. R. Fighera · L. F. F. Royes
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

L. M. Rambo · L. R. Ribeiro · I. D. Della-Pace · D. N. Stamm · R. da Rosa Gerbatin · M. R. Fighera · L. F. F. Royes
Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

I. D. Della-Pace · A. F. Furian · M. S. Oliveira · M. R. Fighera · L. F. F. Royes
Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

M. R. Fighera
Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

L. F. F. Royes (✉)
Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil
e-mail: nandoroyes@yahoo.com.br

Keywords Creatine · Pentylenetetrazol · Na^+ , K^+ -ATPase · Mitochondrial membrane potential · Purine catabolism

Introduction

Creatine (Cr; *N*-[aminoiminomethyl]-*N*-methyl glycine) is a guanidine compound synthesized from glycine, arginine and *S*-adenosylmethionine in the kidneys, liver, pancreas, testis and brain (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Its administration increases intracellular stores of both Cr and its phosphorylated form, phosphocreatine (PCr), in

several tissues including skeletal muscle and the brain (Ipsiroglu et al. 2001; Royes et al. 2006). Due to its role in spatial and temporal energetic buffering, Cr has become one of the most common nutritional supplements taken for improvement of athletic performance (Kraemer and Volek 1999).

Experimental and clinical studies have indicated that chronic Cr supplementation provides neuroprotective effects against several neurological disorders, including Alzheimer's, Parkinson's disease, Huntington's disease, brain ischemia and traumatic brain injury (Adhietty and Beal 2008, Klein and Ferrante 2007). Furthermore, we have shown that acute administration of Cr protects against seizures induced by methylmalonic (Royes et al. 2003, 2006) and glutaric acids (Magni et al. 2007), suggesting an anticonvulsant role for this guanidine compound in experimental models of inborn metabolism errors that present as epileptic phenotypes.

Although there is increasing evidence supporting the use of Cr in the treatment of several neurological diseases, the potential benefits of this compound for patients with convulsive disorders remain poorly defined. While some authors suggest a proconvulsant role of chronic Cr treatment (Mikati et al. 2004; Vielhaber et al. 2003), others suggest that Cr may be an anticonvulsant agent (Rambo et al. 2009). The basis for this discrepancy is unknown; however, methodological differences may account for the apparent disagreement between findings. Important methodological considerations that may have impacted the results of various studies include the convulsant agents administered, the drug doses studied, the administration routes, the animal model species and the parameters evaluated.

Convulsive disorders increase brain energy consumption, and maintenance of energy homeostasis requires a distinct molecular circuitry that provides tight coupling between energy consumption and production (Fox et al. 1988; Jost et al. 2002). As expected under this model, PTZ-induced seizures lead to an increase in local cerebral glucose, a higher creatine kinase (CK) rate constant, increased cellular energy (ATP) utilization and higher ATP turnover (Bonan et al. 2000; Holtzman et al. 1998). Thus, epilepsy is related to a pathological increase in energy demand, mitochondrial dysfunction, decreased ATP levels, alteration of neuronal Ca^{2+} homeostasis, generation of reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced modifications of ion channels (Folbergrova and Kunz 2011).

Neuronal hyperactivity and increased energy consumption are common findings in excitotoxic conditions (Carmody and Brennan 2010), and the Cr-PCr/CK/ATP system may play an important role in the maintenance of ATP levels at sites of ATP consumption, such as Na^+ , K^+ -ATPase. As a result, more detailed studies are required to

assess the anticonvulsant potential of acute Cr administration in diseases that present epileptic phenotypes and to elucidate the underlying molecular mechanisms of Cr activity. For this purpose, we evaluated the effects of acute Cr administration on PTZ-induced electrographic, oxidative (TBARS; protein carbonylation; XO activity) and neurochemical alterations [uric acid levels, purine levels, Na^+ , K^+ -ATPase activity, CK activity and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$)] in the rat cerebral cortex.

Methods

Animals and reagents

Adult male Wistar rats (270–300 g) that were maintained under a controlled environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55 % relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used in this study. Animal utilization protocols conformed to the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee (#115/2010). All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Drug administration protocol and behavioral evaluation

Naïve animals were transferred to a round open field (54.7 cm in diameter) and habituated for 20 min before drug administration. After the habituation period, the animals were treated with Cr (300 mg/kg, p.o.) or its vehicle (1 % carboxymethylcellulose, CMC, p.o.) by intragastric gavage, and PTZ (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.) or its vehicle (0.9 % NaCl, i.p.) was administered 45 min later. The latency period for the appearance of clonic and generalized tonic–clonic seizures and the time spent in generalized tonic–clonic seizures were recorded over the 20-min period after PTZ injection. All drug doses used in the present study were selected based on previous work by our group (Magni et al. 2007; Souza et al. 2009).

Surgical procedures

A subset of the animals were surgically implanted with electrodes under stereotaxic guidance. In brief, animals were anesthetized with Equitesin (1 % phenobarbital, 2 % magnesium sulfate, 4 % chloral hydrate, 42 % propylene glycol, 11 % ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, animals had two screw electrodes placed bilaterally over the parietal cortex (coordinates from bregma, in mm: AP, –4.5; L, 2.5) along with a ground lead positioned over the nasal sinus (Paxinos and Watson 1986). The electrodes were connected to a multipin socket and were fixed to the skull

with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. After surgery, all rats received a single s.c. injection of 0.01 mg/kg buprenorphine hydrochloride for amelioration of pain. Electroencephalographic recordings were performed 7 days after the surgery.

EEG recording, analyses and seizure evaluation

Seizures were monitored in animals by electroencephalographic recording. The rats were allowed to settle for habituation in a Plexiglas cage (25 × 25 × 60 cm) for at least 20 min. Rats were then connected to the lead socket on a swivel inside a Faraday's cage. Routinely, a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. The effect of oral administration of Cr on the seizure activity induced by PTZ was investigated by administering Cr (300 mg/kg, p.o.) or its vehicle (1 % carboxymethylcellulose, p.o.) 45 min before an injection of PTZ (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). The behavior of the animals was monitored, and EEG was concomitantly recorded using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neurotec LTDA, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass; 60 Hz, Notch), digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored on a PC for off-line analysis. EEG recordings were visually analyzed for the appearance of seizure activity. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of alterations in the recording leads, according to McColl et al. (2003). Digitalized data from basal, Cr administration and seizure periods were divided in 30-s segments and a 4-s sample from each segment was used to measure the amplitude wave.

Sample processing

Immediately after the seizure evaluation period, the animals were killed by decapitation, and their brains were exposed by removal of the parietal bone. The cerebral cortex was quickly dissected on an inverted ice-cold Petri dish, and the material was stored at -80°C for subsequent biochemical analyses. Samples were prepared according to the guidelines for each technique, as described below.

Na^+ , K^+ -ATPase activity measurements

The cerebral cortex was homogenized in cold 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The resultant homogenate was used to determine Na^+ , K^+ -ATPase activity. The enzyme activity was measured according to Oliveira et al. (2009). 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 initiated through addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37°C , the reaction was stopped through the addition of 70 μl of 50 % (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with regard to protein and time. Appropriate controls were included in the assays to control for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified with 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.

Creatine kinase (CK) activity

To determine the levels of CK activity in rat plasma, the rats treated with Cr or CMC were euthanized by decapitation, and the whole blood and the brain were quickly collected. The blood was collected in heparinized tubes, incubated at room temperature for 30 min and centrifuged at 1,500g for 10 min at room temperature for plasma separation. The brain samples of the cerebral cortex were processed in the same fashion as the Na^+ , K^+ -ATPase activity samples. The CK activity in the incubation medium was assayed colorimetrically at a wavelength of 340 nm according to the manufacturer's protocol (Labtest reagents, Brazil).

Xanthine oxidase activity measurements

Xanthine oxidase assay was adapted from Prajda and Weber (1975). Briefly, each cerebral cortex was gently homogenized in cold phosphate buffer saline (PBS 30 mM, pH 7.4) containing (in mM): 1 EDTA, 10 dithiothreitol and 1 phenylmethylsulfonyl fluoride. The samples were centrifuged at 2,500 rpm for 10 min (4°C). After centrifugation, the pellet was discarded and an aliquot of supernatant (0.5 mg/mL) was added to the assay medium containing xanthine (0.5 mM). The assay medium was incubated at 37°C for 1 h, and the reaction was stopped by boiling for 10 min. After boiling, acid buffer (sodium acetate/acetic acid, 80 mM, pH 5.5) was added to the medium, and the samples were analyzed spectrophotometrically at a wavelength of 290 nm. Uric acid was used as standard reference, and all experiments were performed in triplicate.

Uric acid determination

For uric acid determination, each cerebral cortex was gently homogenized in cold PBS (30 mM, pH 7.4) and the

resulting homogenate was diluted 1:10 with distilled H₂O. Uric acid levels were determined with a standard commercial kit (Labtest, Porto Alegre, RS, Brasil), according to the manufacturer's protocol. Sample absorbance was determined spectrophotometrically at a wavelength of 290 nm.

Purine levels determination

Determination of ATP, ADP, AMP, ADE and INO levels in the rat cerebral cortex was performed by HPLC–UV detection modified method of Özogul et al. (2000). Briefly, cerebral cortex samples were homogenized in 0.6 mM perchloric acid (1/5, w/v) and centrifuged at 2,400g at 4 °C for 10 min. The supernatant fraction was neutralized to pH 6–6.5 with 1 M potassium hydroxide. The neutralized fractions were held on ice for 30 min for total precipitation of potassium crystals and filtered through a membrane (0.45 µm pore size Millipore®) before injection onto the HPLC instrument. Samples were analyzed on a Shimadzu® HPLC apparatus. The analytical column had 5 µm particles and a 100 Å pore size Phenomenex® ODS-2 C₁₈ reverse-phase column (4.6 × 250 mm, Allcrom, BR). The mobile phase was 0.04 M potassium dihydrogen orthophosphate and 0.06 M dipotassium hydrogen orthophosphate dissolved in purified distilled water and adjusted to pH 7 with 0.1 M potassium hydroxide. HPLC analysis was performed under isocratic conditions at a flow rate of 1 mL/min with the UV detector set to 257 nm.

Cr and PCr (total Cr) levels determination

The Cr and PCr (total Cr) levels were measured in the cerebral cortex and in blood plasma. Briefly, rats that had been treated with Cr or CMC were euthanized by decapitation and the whole blood and the brain were quickly collected. The blood was collected in heparinized tubes, incubated at room temperature for 30 min and centrifuged at 1,500g for 10 min at room temperature for plasma separation. Both brain and plasma were homogenized in 1 ml of 3 mM perchloric acid. The samples were centrifuged at 12,000g for 5 min at –7 °C. After centrifugation, the supernatant was separated and the pH was adjusted to 7.4 with KOH (5 M) and KH₂PO₄ (25 mM). Total Cr content (Cr + PCr) was assayed in the neutralized supernatants by HPLC at controlled room temperature (20 °C) under isocratic conditions using a reversed-phase 125 × 4 mm analytical column protected by a 4 × 4 mm guard cartridge (5 µm particle size, RP-18 Li-Chrosphere 100, Hewlett Packard, The Netherlands). The mobile phase was 14.7 mM KH₂PO₄ in 1.15 mM tetra-*n*-butylammonium hydrogen malate aqueous solution adjusted to pH 5.3 with 5 mM KOH with a flow rate of 1 mL/min. The total

Cr peak was identified by UV detection at 214 nm, as described by Karatzaferi et al. (1999).

Isolation of rat brain mitochondria

Rat brain mitochondria were isolated as described by Tonkonogi and Sahlin (1997) with some modifications. First, the cerebral cortex was quickly removed from the rat skull and homogenized in a buffer containing (in mM): 100 sucrose, 10 EDTA, 100 Tris–HCl, and 46 KCl (pH 7.4). After homogenization, the resulting suspension was centrifuged for 3 min at 2,000g (4 °C) to obtain a low-speed supernatant fraction (S1). S1 was centrifuged for 20 min at 12,000g (4 °C). The pellet was re-suspended in a buffer containing (in mM): 100 sucrose, 10 EDTA, 100 Tris–HCl, 46 KCl and bovine serum albumin (BSA, 0.5 %; pH 7.4) and re-centrifuged for 10 min at 12,000g (4 °C). The supernatant was decanted and the final pellet re-suspended in a buffer containing (in mM): 70 sucrose, 0.02 EDTA, 20 Tris–HCl, 230 mannitol, 1 K₂HPO₄, to yield a protein concentration of 30–40 mg/mL. The isolated mitochondria were used to perform an analysis of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$).

Mitochondrial $\Delta\Psi$ determination

The mitochondrial $\Delta\Psi$ determination was assayed according to Akerman and Wikstrom (1976). Briefly, samples of mitochondria from the cerebral cortex (300 µg protein/mL) were incubated in a medium containing mannitol (230 mM), sucrose (70 mM), EDTA (0.02 mM), K₂HPO₄ (1 mM), Tris (20 mM, pH 7.4), safranin-O (10 µM) and respiratory substrates, glutamate (5 mM) and succinate (5 mM). The reaction was initiated with the addition of mitochondria, and the medium was stirred constantly during the assay period. The fluorescence analysis was performed at 495 nm for excitation and 586 nm for emission with slit widths of 5 nm.

Protein determination

Protein content was colorimetrically determined by the method of Bradford (1976) using BSA (1 mg/mL) as standard.

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed by the Mann–Whitney test and presented as median and interquartile ranges. EEG, XO, uric acid, purine levels and Na⁺, K⁺-ATPase activity measures were analyzed by one- or two-way ANOVA in accordance with the experimental designs. Parametric tests were followed by the post hoc Student–Newman–Keuls

test, and data are expressed as the mean + SEM. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Figure 1 shows the effect of acute Cr administration (300 mg/kg) on behavioral seizures induced by PTZ (60 mg/kg). Statistical analysis revealed that acute Cr treatment increased the latency periods for both the first myoclonic jerk ($U = 79.50$; Fig. 1a) and the first generalized tonic–clonic seizure ($U = 68.00$; Fig. 1b). Cr treatment also reduced time spent in generalized tonic–clonic seizure ($U = 76.00$; Fig. 1c). As depicted in the representative EEG recordings (Fig. 2), administration of PTZ (30 and 45 mg/kg, i.p) did not induce convulsive behavior (data not shown), but PTZ induced the appearance of an EEG pattern characterized by multiple sharp waves in brief spindle episodes and increased wave amplitude (Fig. 2a, 30 mg/kg; Fig. 2c, 45 mg/kg; signal amplification in b and d, respectively). Additionally, PTZ injection at a fully convulsant dose (60 mg/kg) induced convulsive behavior characterized by myoclonic jerks and generalized tonic–clonic seizures. The behavior repertoire observed after PTZ injection (60 mg/kg) occurred concomitantly with electrographically recorded seizures: myoclonic jerks were characterized by multiple sharp waves in brief spindle episodes, whereas generalized seizures were characterized by the appearance of 2–3 Hz high-amplitude activity (Fig. 2e with signal amplification in f). Quantification of electroencephalographic wave amplitude revealed similar EEG signals in both CMC and Cr treatment before PTZ administration (Fig. 2m), indicating that Cr administration did not elicit detectable alterations in basal EEG. On the other hand, Cr prevented the increase in wave amplitude after injection of PTZ at the doses of 30 [$F(2,28) = 8.04$, $p < 0.05$; Fig. 2m], 45 [$F(2,20) = 36.40$, $p < 0.05$; Fig. 2m] and 60 mg/kg [$F(2,34) = 136.39$, $p < 0.05$; Fig. 2m].

Na^+ , K^+ -ATPase activity is essential for the maintenance of membrane electrochemical gradients in the brain, and a decrease in Na^+ , K^+ -ATPase activity can increase brain excitability (Li and Stys 2001). As a result, we investigated the effect of PTZ and Cr administration on Na^+ , K^+ -ATPase activity. Statistical analysis revealed that PZT (at all doses) administration decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity and that acute Cr (300 mg/kg) administration prevented the PZT-induced decrease in Na^+ , K^+ -ATPase activity [$F(7,48) = 26.83$, $p < 0.05$; Fig. 3a].

Na^+ , K^+ -ATPase is responsible for the consumption of approximately 70 % of ATP in the brain (Clausen et al. 1991), and the catabolism of ATP is an important pathway responsible for maintaining an energy supply for this

enzyme. As a result, we sought to measure the effect of Cr treatment on brain and plasma CK activity; CK is responsible for the resynthesis of ATP from ADP plus PCr in sites of energy consumption such as Na^+ , K^+ -ATPase (Adihetty and Beal 2008). Statistical analysis indicated that acute Cr administration increased CK activity in brain [$t(6) = 3.041$; $p < 0.05$, Fig. 3b] but not in plasma [$t(6) = 1.946$; $p > 0.05$, Fig. 3b]. We also measured the effect of Cr treatment on the levels of ATP and ATP metabolites in the cerebral cortex of rats subjected to PTZ injection. Statistical analysis also showed that PTZ (all doses) administration decreased ATP [$F(7,32) = 6.72$, $p < 0.05$; Fig. 4a] and ADP [$F(7,32) = 8.57$, $p < 0.05$; Fig. 4b] levels, and Cr prevented these changes in ATP and ADP levels. Cr administration also attenuated the increase in AMP [$F(7,32) = 5.33$, $p < 0.05$; Fig. 4c], adenosine [$F(7,32) = 3.40$, $p < 0.05$; Fig. 4d] and inosine [$F(7,32) = 4.50$, $p < 0.05$; Fig. 4e] levels that are typically induced by PTZ administration (60 mg/kg). Furthermore, Cr treatment increased total Cr content both in the brain [$t(6) = 3.267$; $p < 0.05$, Fig. 4f] and in the plasma [$t(6) = 10.090$; $p > 0.05$, Fig. 4f].

In the present study, we also found that injection of a fully convulsant dose of PTZ (60 mg/kg) increased both XO activity (Fig. 5a) and uric acid levels (Fig. 5b). Cr treatment prevented both the PTZ-induced increase in XO activity [$F(7,48) = 6.63$, $p < 0.05$; Fig. 5a] and the PTZ-induced uric acid accumulation [$F(7,32) = 2.42$, $p < 0.05$; Fig. 5b]. In addition, Cr treatment increased $\Delta\Psi$ (Fig. 6) and blunted the $\Delta\Psi$ decrease induced by PTZ at doses of 30, 45 and 60 mg/kg [$F(7,32) = 14.43$, $p < 0.05$; Fig. 6]. Moreover, Cr treatment also protected against the protein carbonyl [$F(7,32) = 9.12$, $p < 0.05$; Fig. 7a] and TBARS [$F(7,32) = 5.83$, $p < 0.05$; Fig. 7b] increase induced by all doses of PTZ. The results are summarized in Fig. 8

Discussion

In the present study, we confirmed and extended our previous findings that PTZ elicits behavioral seizures, electrographic seizures and oxidative stress (Rambo et al. 2009; Ribeiro et al. 2005; Schneider Oliveira et al. 2004; Souza et al. 2009). For the first time, we showed that acute Cr treatment (300 mg/kg) attenuates EEG alterations and delays the appearance of both clonic and generalized tonic–clonic seizures induced by PTZ. The idea that mitochondrial dysfunction may play a critical role in oxidative stress during seizure onset and spreading was supported by our findings of increased purine degradation, increased lipid peroxidation, protein carbonylation, increased uric acid content and increased XO activity and decreased mitochondrial $\Delta\Psi$ after single doses of PTZ (Folbergrova and Kunz 2011).

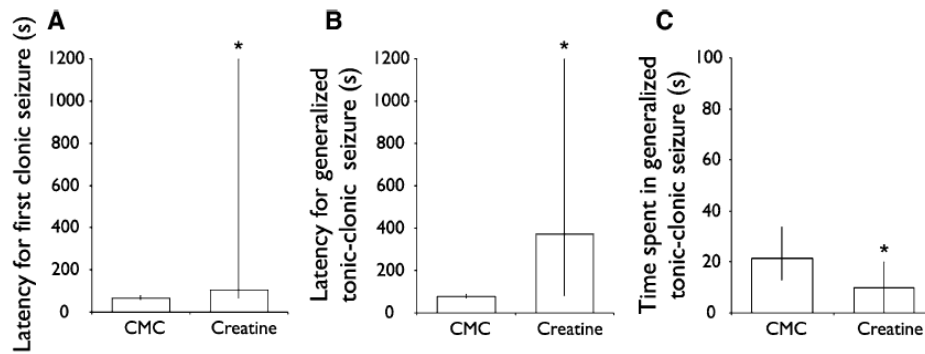


Fig. 1 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on the convulsive behavior induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). **a** Latency for first clonic seizure; **b** latency for generalized tonic-clonic seizure;

c time spent in generalized tonic-clonic seizure. Data are presented as median and interquartile range. * $p < 0.05$ compared with CMC-treated group (Mann-Whitney test)

Moreover, the observed inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity that resulted from all doses of PTZ suggests that the failure of some selected targets may increase cellular excitability, facilitating the appearance and propagation of convulsions (Patel 2004; Rambo et al. 2009).

Key factors influencing normal and abnormal biochemical signaling in the brain include cellular and mitochondrial bioenergetics (Shin et al. 2011). In this context, mitochondrial dysfunction contributes to several neurological disorders and has been recently implicated in acquired epilepsies (Waldbaum and Patel 2010). Compelling evidence for mitochondrial dysfunctions in this neurological disease comes from the observation that metabolic and bioenergetic changes occur following acute seizures. For example, rats submitted to PTZ administration present increased nucleotide hydrolysis in blood serum (Bruno et al. 2003) and cerebrospinal fluid (Oses et al. 2007). Additionally, a significant increase in nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes was observed soon after *status epilepticus* was induced by pilocarpine and kainic acid (Bonan et al. 2000), suggesting that nucleotide and nucleoside metabolism are involved in epilepsy. The activation of this neurochemical pathway increases the production of ROS (Tada et al. 1991; Zagnoni et al. 1994) and facilitates the appearance and/or propagation of seizures in several models of epilepsy (Frantseva et al. 2000; Gupta et al. 2003; Patsoukis et al. 2005; Souza et al. 2009). Moreover, the increases in uric acid levels and XO activity documented in this report support the idea that uric acid levels reflect the increase in XO activity and subsequent free radical production (Kanemitsu et al. 1989). Thus, in an environment lacking adequate supplies of primary and alternative sources of energy that is simultaneously limited by constraints on energy expenditure, brain dysfunction and seizures are expected (Masino and Geiger 2008). On the other hand, Cr supplementation can supply a potent energy source that helps the cell maintain the ATP/

ADP ratio by activating CK in sites of energy production (mitochondria) and consumption (ATPase), reducing ADP formation and the formation of all successive catalytic products downstream. As a result, hydrogen peroxide and superoxide formation through the XO reaction would be attenuated (Mills et al. 1997). Accordingly, our results show that acute Cr supplementation increased neuronal CK activity, stabilized the purine content, stabilized XO activity and reduced the oxidative damage to proteins and lipids triggered by seizures.

Findings in the literature have shown that Cr increases the prevalence of the octameric form of mitochondrial creatine kinase (MtCK); this enzyme interacts with components of the mitochondrial permeability transition pore (MtPTP), suppressing pore opening and potentially reducing apoptotic susceptibility (Adhietty and Hood 2003). Additionally, we found that acute Cr supplementation increases mitochondrial $\Delta\Psi$ and CK activity. In this sense, we believe that Cr can maintain and improve both mitochondrial function and energy generation while reducing ROS formation during excitotoxic processes, like seizures, that result in energy depletion. Given the role of Cr in cellular energy homeostasis, the therapeutic efficacy of Cr is most promising in the neurological disorders that have marked impairment in energy metabolism (Adhietty and Beal 2008). For example, mice with a gene knockout of cytosolic CK show decreased habituation in open field, reduced learning in the Morris Water Maze, and delayed development of PTZ-induced epileptic seizures (Jost et al. 2002). These experimental studies suggest that Cr depletion in the brain may be associated with disruption of neuronal functions and increased excitability.

Epileptic seizures are associated with decreased PCr/ATP ratios in the brain (Pan et al. 2005), indicating that vast amounts of energy are being used. In this context, a considerable body of data provides evidence that ROS generation during *status epilepticus* affects oxidative

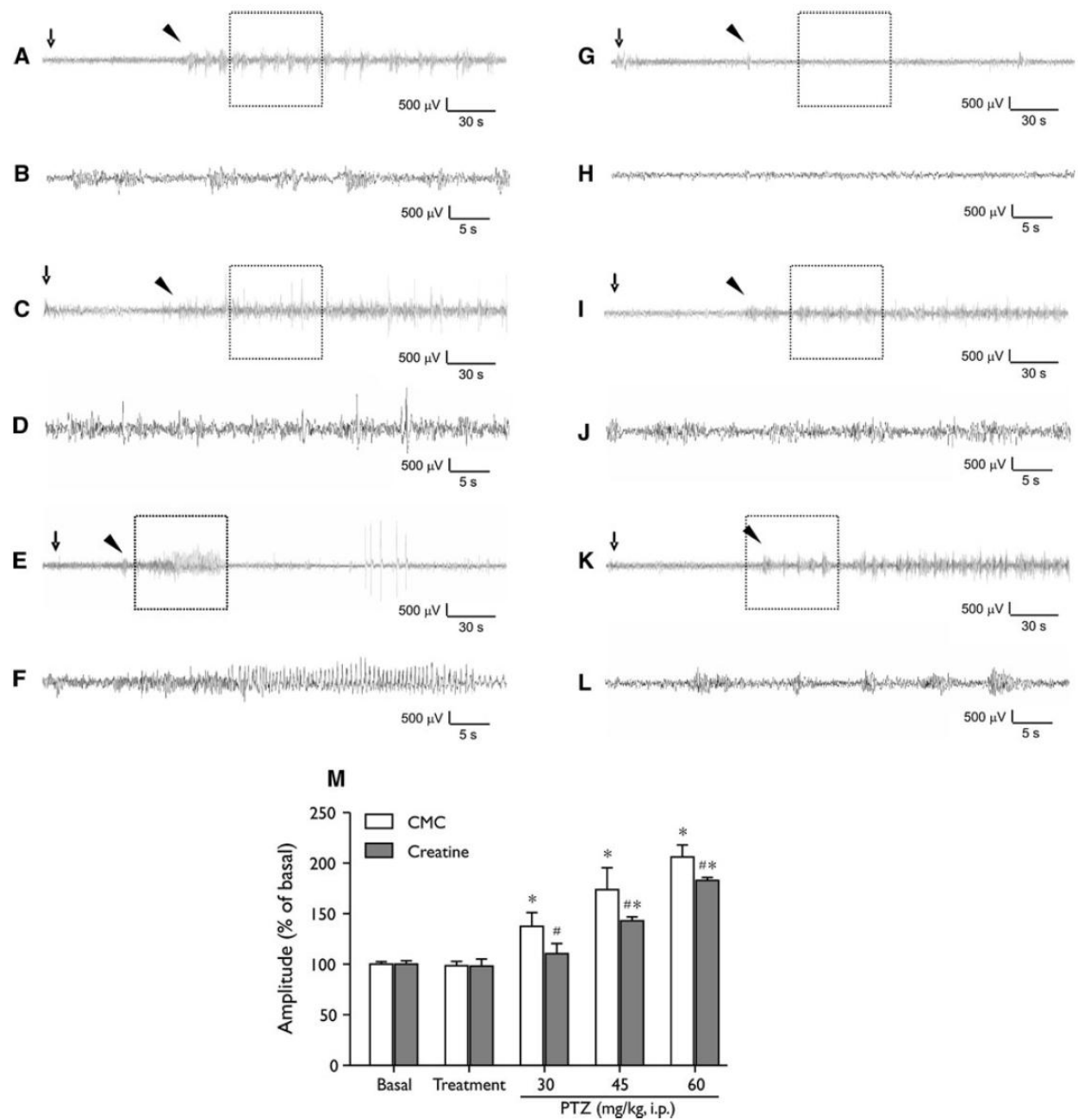


Fig. 2 Representative electroencephalographic recordings of animals treated with CMC (a–f) or creatine (g–l) after PTZ injection (30 a and g, 45 c and i, and 60 mg/kg e and k, i.p.) and wave amplitude quantification (m). Arrows PTZ injection, arrowheads the first clonic

seizure. EEG signals in boxes in a, c, e, g, i and k are shown in higher detail in b, d, f, h, j, l, respectively. * $p < 0.05$ compared with Basal-CMC period; # $p < 0.05$ compared with respective CMC-PTZ-treated group

phosphorylation by inhibiting mitochondrial respiratory enzymes (Bruce and Baudry 1995; Patel and Li 2003; Poderoso et al. 1996; Sullivan et al. 2003). Furthermore, recent findings suggest that treatment with compounds possessing antioxidant properties targeting mitochondria can influence the extent of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in models of epileptic seizures

(Folbergrova and Kunz 2011). As decreased ATP levels may increase neuronal excitability by causing a reduction in neuronal plasma membrane potential (Patel 2004), it is plausible to propose that Cr maintains neuronal energy provision and it protects against purine catabolism, Na^+ , K^+ -ATPase inhibition, disruption of mitochondrial functions and ROS generation after PTZ administration.

Fig. 3 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat cerebral cortex after PTZ injection (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Data are presented as the mean + SEM (*n* = 7 per group). **p* < 0.05 compared with CMC-NaCl group; †*p* < 0.05 compared with respective CMC-PTZ-treated group; #*p* < 0.05 compared with CMC-PTZ30-treated group

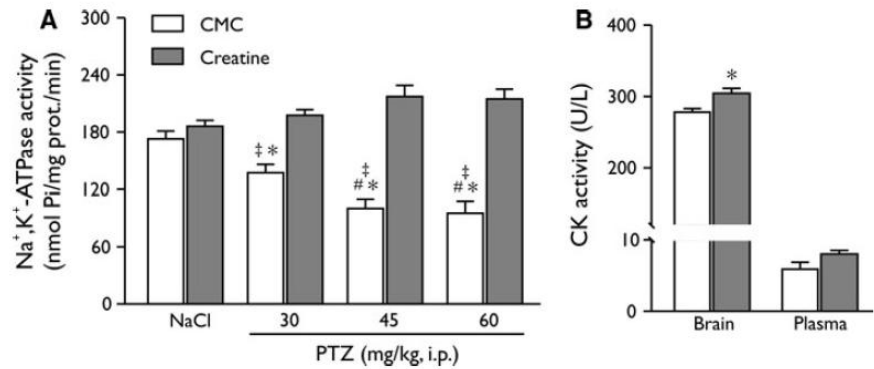
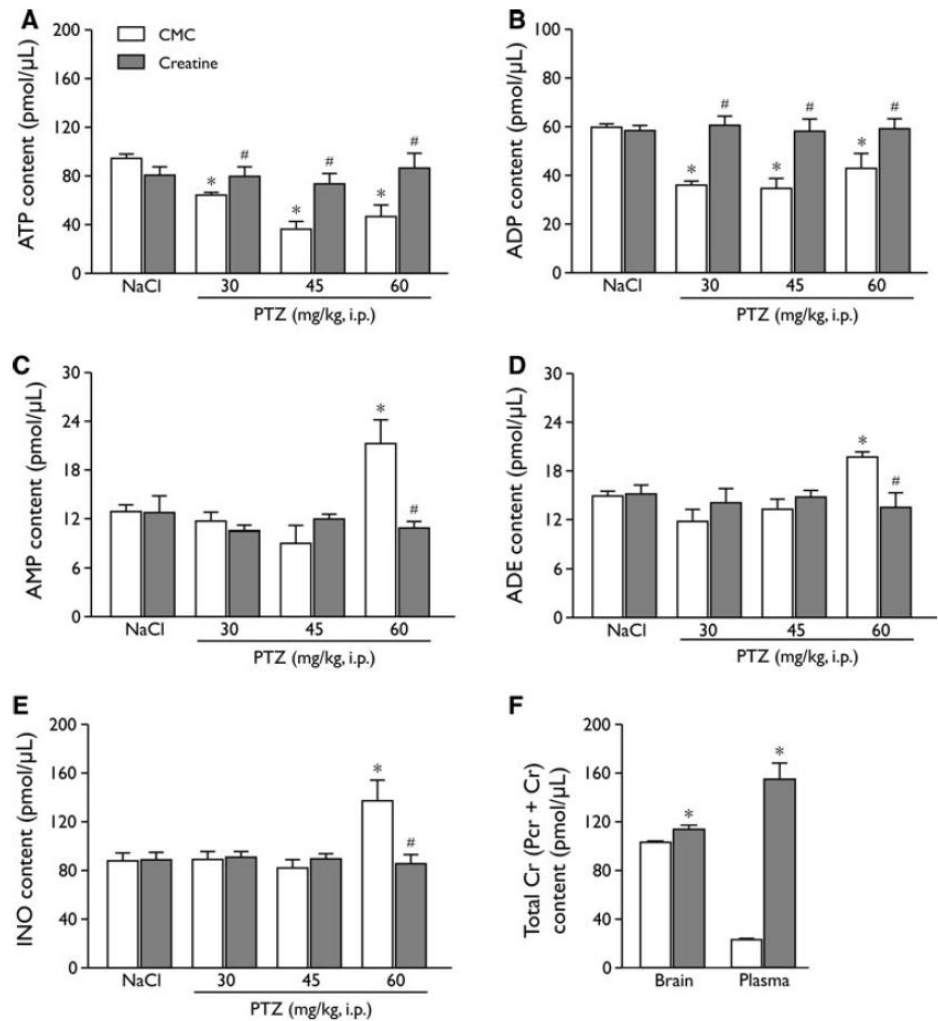


Fig. 4 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on ATP (a), ADP (b), AMP (c), ADE (adenosine d) and INO (inosine e) content in the rat cerebral cortex after PTZ injection (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Data are presented as the mean + SEM (*n* = 5 per group). **p* < 0.05 compared with CMC-NaCl group; #*p* < 0.05 compared with respective CMC-PTZ group



In the present study, we revealed that acute Cr treatment induced mitochondrial $\Delta\Psi$ increase and was effective against mitochondrial $\Delta\Psi$ and Na⁺, K⁺-ATPase inhibition induced by PTZ (all doses). Furthermore, the Cr administration increased the CK activity in the brain and total Cr content in the brain and plasma. These experimental

findings reinforce the importance of sufficient ATP supply for maintenance of normal synaptic transmission (Streijger et al. 2010). In addition, our results are consistent with studies suggesting a direct link between mitochondrial dysfunction, neuronal excitability increase, decreased ATP levels (Canafoglia et al. 2001), alterations of neuronal

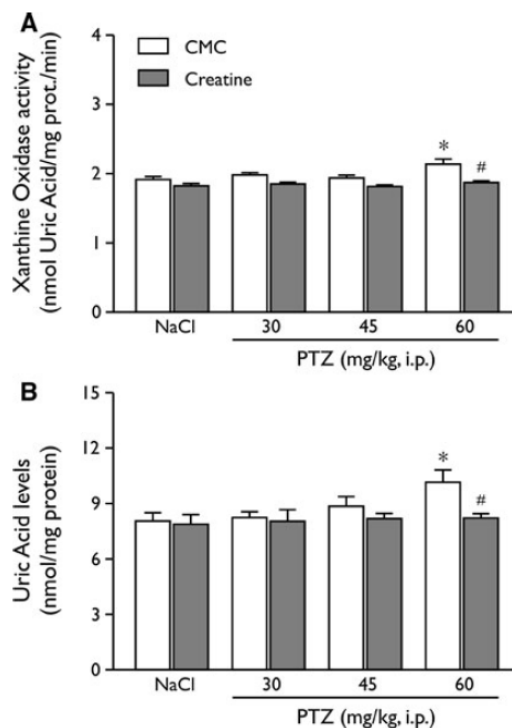


Fig. 5 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on xanthine oxidase activity (a) and uric acid levels (b) in the rat cerebral cortex after PTZ injection (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Data are presented as the mean + SEM ($n = 5-7$ per group). * $p < 0.05$ compared with CMC-NaCl group; # $p < 0.05$ compared with respective CMC-PTZ group

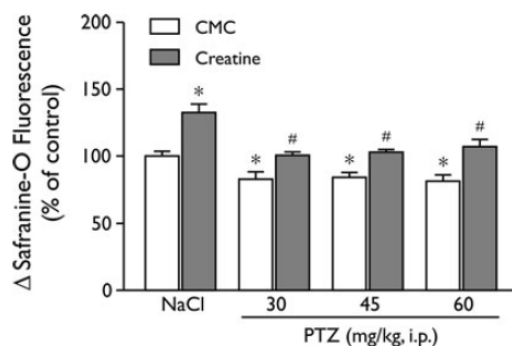


Fig. 6 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) in the rat cerebral cortex after PTZ injection (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Data are presented as the mean + SEM ($n = 5$ per group). * $p < 0.05$ compared with CMC-NaCl group; # $p < 0.05$ compared with respective CMC-PTZ group

calcium homeostasis (Brini et al. 1999; Streijger et al. 2010), ROS-induced modifications of ion channels and neurotransmitter release (Bindokas et al. 1998; Kilbride et al. 2008). Considering that failure of some targets, such as Na^+ , K^+ -ATPase, increase cellular excitability and facilitate the appearance and/or propagation of convulsions

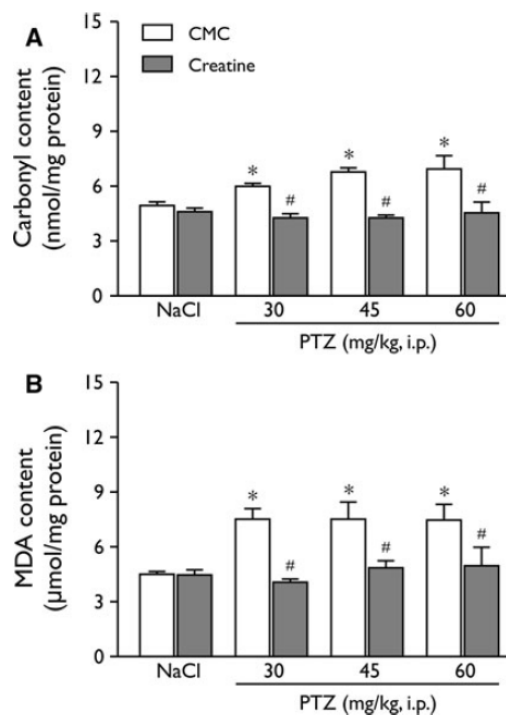


Fig. 7 Effect of acute creatine administration (300 mg/kg, p.o.) on protein carbonyl (a) and TBARS (b) content in the rat cerebral cortex after PTZ injection (30, 45 or 60 mg/kg, i.p.). Data are presented as the mean + SEM ($n = 5$ per group). * $p < 0.05$ compared with CMC-NaCl group; # $p < 0.05$ compared with respective CMC-PTZ group

(Rambo et al. 2009, Souza et al. 2009), we suggest that the protection induced by Cr results in decreased neuronal excitability and a lessening of the oxidative damage caused by PTZ. In fact, experimental findings have demonstrated that the Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor ouabain increases Ca^{2+} influx in brain slices (Fujisawa et al. 1965), induces electrographic seizures in mice (Jamme et al. 1995), increases glutamate release by reversal of the Na^+ -dependent transporter (Li and Stys 2001), and increases cell death in rat hippocampi (Lees et al. 1990). Furthermore, Clapcote et al. (2009) showed that a mutation in the catalytic α_3 isoform (a mutation that reduces Na^+ , K^+ -ATPase activity approximately 42 % in mice brain) was associated with hyperexcitability in the CNS. Additionally, a mutation in the Na^+ , K^+ -ATPase α_2 isoform has been related to sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures in humans (Gallanti et al. 2008).

In the present study, we demonstrated that neuronal energy levels, mitochondrial membrane potential, Na^+ , K^+ -ATPase activity and oxidative stress markers in cortical homogenates were affected after seizures elicited by PTZ. These experimental findings suggest that mitochondrial dysfunction may play a critical role in oxidative stress and brain damage associated with epileptic seizures.

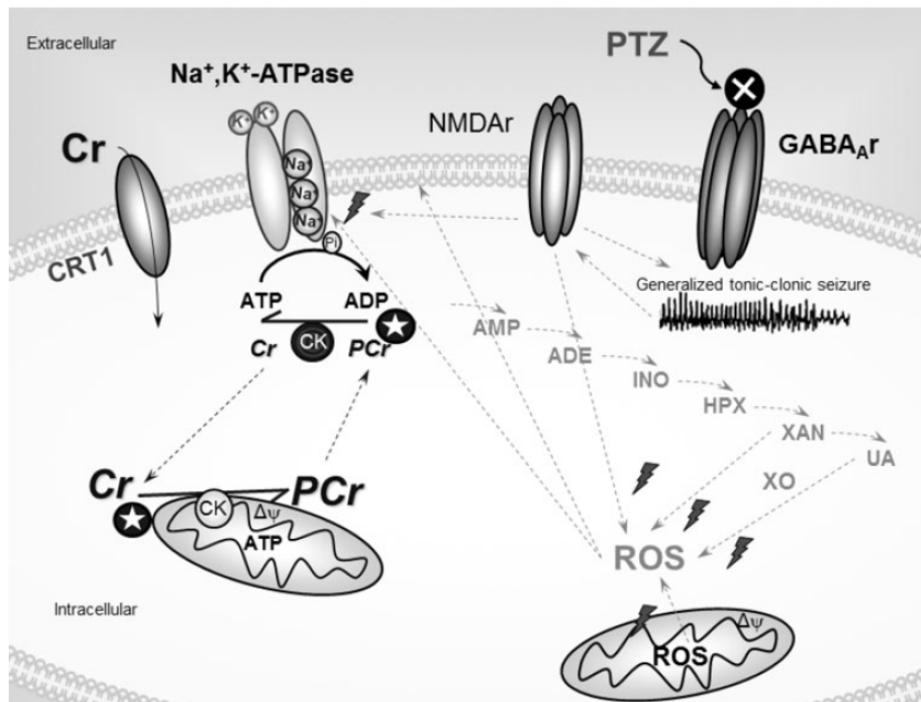


Fig. 8 Illustrative figure highlighting the main findings: PTZ injection antagonizes GABA_A receptors. Such decrease of inhibitory components of the neuron elicits behavioral and electrographic seizures by disrupting neuronal membrane potential. It activates Na⁺, K⁺-ATPase and increases the ATP catabolism, resulting in ROS generation via increase of xanthine oxidase activity (XO). The

excitability induced by PTZ induces an energy demand increase that in turn generates more ROS via mitochondria. The ROS generation increases the reaction with selected cell targets such as phospholipidic membranes and inhibits Na⁺, K⁺-ATPase. The creatine treatment maintains and improves mitochondrial function, reducing ROS generation during excitotoxic processes elicited by PTZ

Furthermore, CR administration results in an increase in $\Delta\Psi$ and CK activity and effectively protects against the changes of neuronal energy levels, mitochondrial membrane potential dysfunction, Na⁺, K⁺-ATPase activity and oxidative stress in cortical homogenates. This suggests that acute Cr treatment helps maintain an adequate energy supply and buffers brain energy levels, highlighting the potential of acute Cr administration as a strategy for treatment of convulsive disorders. However, it is important to note that Cr metabolism varies among species; consequently, the effects observed in mice do not necessarily translate into similar findings in clinical studies (Andres et al. 2008; Beal 2011; Gualano et al. 2009, 2011; Klopstock et al. 2011).

Acknowledgments The authors thank Dr. Guilherme Bresciani for critical reading of the manuscript. This work was supported by FA-PERGS/CNPq (Grant: #11/2082-4). L.F.F. Royes, M.R. Figuera and L.M. Rambo are the recipients of CNPq fellowships (Grant: #141164/2010-7). I. Della-Pace is the recipient of CAPES fellowships. We confirm that we have read the journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. In addition, we would like to state that all authors have observed and approved the study and that no part of the submitted work has been published or is under consideration for publication elsewhere. Moreover, the present work was supported by government

funding and has no financial or other relationships that might lead to a conflict of interest. We also would like to declare that all experiments were carried out according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996 and that the University Ethics Committee approved the respective protocols.

References

- Adhihetty PJ, Beal MF (2008) Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromol Med* 10:275–290
- Adhihetty PJ, Hood DA (2003) Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Appl myol* 13:171–179
- Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68:191–197
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329–343
- Beal MF (2011) Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids* 40:1305–1313
- Bindokas VP, Lee CC, Colmers WF, Miller RJ (1998) Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 18:4570–4587
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000) Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 25:775–779

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brini M, Pinton P, King MP, Davidson M, Schon EA, Rizzuto R (1999) A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* 5:951–954
- Bruce AJ, Baudry M (1995) Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic Biol Med* 18:993–1002
- Bruno AN, Oses JP, Amaral O, Coitinho A, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ (2003) Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Brain Res Mol Brain Res* 114:140–145
- Canafoglia L, Franceschetti S, Antozzi C, Carrara F, Farina L, Granata T, Lamantea E, Savoiardo M, Uziel G, Villani F, Zeviani M, Avanzini G (2001) Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders. *Neurology* 56:1340–1346
- Carmody S, Brennan L (2010) Effects of pentylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain. *Neurochem Int* 56:340–344
- Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Rodacker Schack V, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Minassian BA, Ackerley CA, Sled JG, Cortez MA, Henderson JT, Vilsen B, Roder JC (2009) Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺, K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14085–14090
- Clausen T, Van Hardeveld C, Everts ME (1991) Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol Rev* 71:733–774
- Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400
- Folbergrova J, Kunz WS (2011) Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion* 12:35–40
- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C (1988) Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241:462–464
- Frantseva MV, Velazquez JL, Hwang PA, Carlen PL (2000) Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci* 12:1431–1439
- 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. *Jpn J Pharmacol* 15:327–334
- Gallanti A, Tonelli A, Cardin V, Bussone G, Bresolin N, Bassi MT (2008) A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures. *J Neurol Sci* 273:123–126
- Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH (2009) Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* 38:31–44
- Gualano B, Roschel H, Lancha-Jr AH, Brightbill CE, Rawson ES (2011) In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids* 43:519–529
- Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK (2003) Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74:579–585
- Holtzman D, Togliatti A, Khait I, Jensen F (1998) Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* 44:410–414
- Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Hoger H, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S (2001) Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-mono-hydrate in various animal species. *Life Sci* 69:1805–1815
- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333–337
- Jost CR, Van Der Zee CE, In 't Zandt HJ, Oerlemans F, Verheij M, Streijger F, Franssen J, Heerschap A, Cools AR, Wieringa B (2002) Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci* 15:1692–1706
- Kanemitsu H, Tamura A, Kirino T, Oka H, Sano K, Iwamoto T, Yoshiura M, Iriyama K (1989) Allopurinol inhibits uric acid accumulation in the rat brain following focal cerebral ischemia. *Brain Res* 499:367–370
- Kilbride SM, Telford JE, Tipton KF, Davey GP (2008) Partial inhibition of complex I activity increases Ca-independent glutamate release rates from depolarized synaptosomes. *J Neurochem* 106:826–834
- Klein AM, Ferrante RJ (2007) The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46:205–243
- Karatzafieri C, De Haan A, Offringa C, Sargeant AJ (1999) Improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of “high-energy” phosphates in mammalian skeletal muscle. Application to a single-fibre study in man. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 730:183–191
- Klopstock T, Elstner M, Bender A (2011) Creatine in mouse models of neurodegeneration and aging. *Amino Acids* 40(5):1297–1303
- Kraemer WJ, Volek JS (1999) Creatine supplementation. Its role in human performance. *Clin Sports Med* 18:651–666 ix
- Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A (1990) The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 120:159–162
- Li S, Stys PK (2001) Na⁺-K⁺-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na⁺-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107:675–683
- Magni DV, Oliveira MS, Furian AF, Fiorenza NG, Figuera MR, Ferreira J, Mello CF, Royes LF (2007) Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res* 1185:336–345
- Masino SA, Geiger JD (2008) Are purines mediators of the anticonvulsant/neuroprotective effects of ketogenic diets? *Trends Neurosci* 31:273–278
- McColl CD, Horne MK, Finkelstein DI, Wong JY, Berkovic SF, Drago J (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234–243
- Mikati MA, Kurdit RM, Rahmeh AA, Farhat F, Abu Rialy S, Lteif L, Francis E, Geha G, Maraashli W (2004) Effects of creatine and cyclocreatine supplementation on kainate induced injury in pre-pubescent rats. *Brain Inj* 18:1229–1241
- Mills PC, Smith NC, Harris RC, Harris P (1997) Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. *Res Vet Sci* 62:11–16
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416–426
- Osés JP, Viola GG, de Paula Cognato G, Junior VH, Hansel G, Bohmer AE, Leke R, Bruno AN, Bonan CD, Bogo MR, Portela LV, Souza DO, Sarkis JJ (2007) Pentylenetetrazol kindling alters adenine and guanine nucleotide catabolism in rat hippocampal slices and cerebrospinal fluid. *Epilepsy Res* 75:104–111
- Özogul F, Taylor AKD, Quantick P, Özogul Y (2000) A rapid HPLC-determination of ATP-related compounds and its applications to

- herring stored under modified atmosphere. *Int J Food Sci Technol* 35:549–554
- Pan JW, Kim JH, Cohen-Gadol A, Pan C, Spencer DD, Hetherington HP (2005) Regional energetic dysfunction in hippocampal epilepsy. *Acta Neurol Scand* 111:218–224
- Patel M (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37:1951–1962
- Patel M, Li QY (2003) Age dependence of seizure-induced oxidative stress. *Neuroscience* 118:431–437
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA, Panagopoulos NT (2005) Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Epilepsia* 46:1205–1211
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85–92
- Prajda N, Weber G (1975) Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 59:245–249
- Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, Silva LF, Retamoso LT, Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, Mello CF, Royes LF (2009) Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 55:333–340
- Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF (2005) alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66:185–194
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga AL, Wajner M, Mello CF (2003) Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118:1079–1090
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Myskiw Jde C, Fiorenza NG, Petry JC, Coelho RC, Mello CF (2006) Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav* 83:136–144
- Schneider Oliveira M, Flavia Furian A, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, de Carvalho Myskiw J, Gindri Fiorenza N, Mello CF (2004) Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721–728
- Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim WK, Ko KH, Bach JH, Hong JS, Yoneda Y, Kim HC (2011) Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int* 59:122–137
- Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF (2009) Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50:811–823
- Streijger F, Scheenen WJ, van Luijtelar G, Oerlemans F, Wieringa B, Van der Zee CE (2010) Complete brain-type creatine kinase deficiency in mice blocks seizure activity and affects intracellular calcium kinetics. *Epilepsia* 51:79–88
- Sullivan PG, Dube C, Dorenbos K, Steward O, Baram TZ (2003) Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol* 53:711–717
- Tada H, Morooka K, Arimoto K, Matsuo T (1991) Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. *Epilepsia* 32:279–283
- Tonkonogi M, Sahlin K (1997) Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. *Acta Physiol Scand* 161:345–353
- Vielhaber S, Von Oertzen JH, Kudin AF, Schoenfeld A, Menzel C, Biersack HJ, Kral T, Elger CE, Kunz WS (2003) Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44:193–199
- Waldbaum S, Patel M (2010) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *J Bioenergy Biomembr* 42:449–455
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213
- Zagnoni PG, Bianchi A, Zolo P, Canger R, Cornaggia C, D'Alessandro P, DeMarco P, Pisani F, Gianelli M, Verze L et al (1994) Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia* 35:107–112

4 DISCUSSÃO

Calcula-se que a epilepsia atinja cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo e que a cada ano somam-se cerca de dois milhões de novos casos (STRINE et al., 2005). Estima-se ainda que 80% das pessoas com epilepsia vivam em países em desenvolvimento, onde 60-90% destas não recebem nenhum tipo de tratamento (SANDER, 2003). Ainda assim, mesmo com incontáveis trabalhos neste campo de estudo, a epilepsia ainda não tem cura.

Quanto às questões relativas ao tratamento da epilepsia, sabe-se que mesmo sem cura, os tratamentos mais usuais disponíveis atualmente conseguem alcançar sucesso em cerca de 70% dos casos (ELGER, 2003). Entretanto, nota-se um alto índice de casos não responsivos aos tratamentos disponíveis atualmente, mesmo após a intervenção farmacológica com três ou mais fármacos antiepilépticos (ELGER, 2003). Neste sentido, os estudos experimentais são de grande valia para a compreensão da fisiopatologia envolvida nestas manifestações, assim como para a identificação de novas terapias para a epilepsia (LOSCHER, 2011).

Dessa forma, considerando-se que existem várias lacunas no entendimento dos processos relacionados tanto com a gênese quanto com a propagação de crises epiléticas, a presente tese procurou elucidar o papel dos ROS e de alguns alvos específicos, sensíveis ao estresse oxidativo, na gênese e propagação dessas crises. Além disso, essa tese buscou investigar também o papel da creatina e do exercício físico sobre parâmetros comportamentais, eletroencefalográficos e neuroquímicos, em um modelo de convulsões induzidas por PTZ, em ratos. Este modelo de convulsão é amplamente utilizado em testes de *screening* de novos fármacos com valor preditivo antiepiléptico (KUPFERBERG, 2001).

Os dados experimentais apresentados no primeiro artigo dessa tese mostraram que a suplementação crônica com creatina e o programa de treinamento físico aeróbico protegeram das convulsões induzidas por PTZ. Além disso, quando combinados, estes efeitos anticonvulsivantes tiveram um

efeito aditivo àqueles isolados. Verificou-se também que tanto a suplementação crônica com creatina, quanto o programa de treinamento físico, ou sua combinação controlaram o aumento na lipoperoxidação e na carbonilação de proteínas, a redução no conteúdo de resíduos de tióis não-proteicos e da atividade das enzimas SOD, CAT e Na^+, K^+ -ATPase induzidas por diferentes doses de PTZ.

Considerando-se que a falha de alguns alvos específicos a ROS, tais como a enzima Na^+, K^+ -ATPase, podem aumentar a excitabilidade neuronal e facilitar o aparecimento e a propagação das convulsões, sugere-se que o aumento nas defesas antioxidantes e/ou a redução na produção basal de oxidantes proteja contra a inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida por PTZ. De fato, o treinamento físico *per se* aumentou a atividade de uma importante enzima antioxidante, a SOD. Não obstante, tanto o treinamento físico quanto a suplementação crônica com creatina *per se* também aumentaram o conteúdo de grupamentos sulfidris não proteicos. Acredita-se, desta forma, que os efeitos *per se* evidenciados sejam um dos, se não os principais achados deste estudo, visto que contemplam a teoria de que agentes com capacidade antioxidante poderiam atuar como antiepilépticos ou até mesmo antiepiléptogênicos (AGUIAR et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados nessa tese, estudos na literatura relatam que o treinamento físico de cunho aeróbico tem a capacidade de aumentar a biogênese mitocondrial, assim como a expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes (RADAK; CHUNG; GOTO, 2008; STEINER et al., 2011). Sabe-se que apenas uma sessão de atividade física aumenta a produção de ROS. Entretanto, a atividade física regular promove uma resposta adaptativa específica a estes níveis aumentados de ROS, tais como a estimulação na atividade de enzimas antioxidantes, grupamentos tióis e aumento no reparo do dano oxidativo (RADAK et al., 2001). Além disso, a estimulação da biogênese mitocondrial é outro importante fator que pode estar contribuindo para os efeitos benéficos do exercício físico, visto que um maior número de mitocôndrias significa uma maior capacidade de produção de energia através da fosforilação oxidativa (PUIGSERVER; SPIEGELMAN, 2003), principalmente em situações patológicas de aumento na demanda energética, como no caso de crises epiléticas.

Cabe salientar que, dentre as opções de protocolo para o treinamento físico, escolheu-se o protocolo de natação devido ao fato de que oferece vantagens sobre outras opções, como o protocolo de esteira, pois o nado é uma habilidade natural dos roedores. Sendo assim, esse protocolo exclui a necessidade de se selecionar os animais, pois no caso da esteira, alguns roedores se negam a correr (ARIDA et al., 1999). Além disso, o protocolo de esteira oferece outras desvantagens como a dificuldade de se manter a velocidade constante, além da presença de estímulos elétricos, que podem vir a influenciar no resultado (GOBATTO et al., 2001). Conforme trabalhos anteriores (SOUZA et al., 2009), neste estudo o exercício físico também estabilizou os níveis de lactato sanguíneo, possivelmente através de adaptações aeróbicas musculares, que levam a uma baixa produção e/ou uma remoção aumentada desse lactato (JONES; CARTER, 2000). Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura, onde o trabalho de natação induz adaptações aeróbicas musculares em ratos, similares às aquelas observadas em humanos (VOLTARELLI; GOBATTO; DE MELLO, 2002).

Nos dados experimentais apresentados no segundo artigo dessa tese, a administração aguda de creatina protegeu contra as convulsões induzidas por PTZ. O tratamento agudo com creatina também preveniu contra a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e Xantina Oxidase, redução no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) e nos conteúdos de ATP e ADP, assim como do aumento nos conteúdos de AMP, Adenosina, Inosina, Ácido Úrico, proteína carbonilada e lipoperoxidação, após convulsões induzidas por PTZ. Além disso, a administração aguda de creatina *per se* aumentou o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Considerando que o componente oxidativo está presente na gênese e na propagação de crises, é possível sugerir que a manutenção do potencial de membrana mitocondrial induzido pela creatina proteja da excitotoxicidade evidenciada neste modelo de convulsão.

Outro possível mecanismo de proteção exercido pela creatina pode estar relacionado a uma possível melhora nas capacidades antioxidantes. Neste ponto de vista, tem sido descrito que a creatina pode atuar como um antioxidante direto, uma vez que protege contra a toxicidade induzida por radicais como superóxido e peroxinitrito (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2011). Somando-se a isto, tem sido demonstrado que a suplementação com

creatina pode exercer um papel antioxidante por estabilizar a isoforma mitocondrial da creatina quinase (mitCK) na sua conformação octamérica que, por sua vez, reage com componentes dos poros de transição mitocondrial, suprimindo assim a abertura destes poros, prevenindo o aumento nos níveis citosólicos de Ca^{2+} e o aumento na produção de ROS mitocondriais, reduzindo assim a morte celular por apoptose em situações de excitotoxicidade (O'GORMAN et al., 1997; DOLDER et al., 2003). De acordo com estes achados da literatura, os dados desta tese corroboram com o fato de que a creatina aumenta a estabilidade mitocondrial, visto pelo aumento na atividade da enzima creatina quinase cerebral e o aumento no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).

Em outro ponto de vista, pode-se atribuir parte dos efeitos protetores da creatina ao seu conhecido papel de tamponamento energético, o que não exclui o componente mitocondrial, visto que a produção de ATP, e a síntese de fosfocreatina ocorrem através da ativação dessa organela. Nesse sentido, verificamos que a administração aguda de creatina protegeu contra a redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela injeção de diferentes doses de PTZ. Esta proteção pode ter ocorrido por dois mecanismos: o primeiro, sendo pelo papel antioxidante da creatina, desde que a enzima Na^+, K^+ -ATPase é extremamente sensível ao ataque de ROS; e o segundo, devido ao rápido fornecimento de energia, através da reação da enzima creatina quinase, clivando a fosfocreatina e ressintetizando o ATP (figura 4). Cabe salientar que a enzima Na^+, K^+ -ATPase consome cerca de 30% de toda a energia corporal dos mamíferos, sendo a responsável por cerca de 70% de toda a energia consumida pelo encéfalo (CLAUSEN; VAN HARDEVELD; EVERTS, 1991; CLAUSEN, 1998). Além disso, a demanda energética ainda pode ser aumentada em situações de excitabilidade neuronal, como no caso de crises epiléticas. Neste sentido, compostos como a creatina, que tem a capacidade de gerar rapidamente o ATP para este importante sítio celular de consumo de energia, podem auxiliar no controle da excitabilidade neuronal. Esta inferência concorda com os dados encontrados aqui, de que a creatina estabilizou os níveis de ATP e ADP e a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, que foram reduzidos pela injeção de diferentes doses de PTZ. De fato, estudos clínicos e experimentais relatam que pacientes com erros inatos do

metabolismo da creatina apresentam graves sintomas neurológicos, como lento desenvolvimento, atraso no aprendizado da fala, retardo mental e epilepsia (AMES, 2000). Estas observações fornecem fortes evidências da importância fisiológica do sistema creatina-creatina quinase-fosfocreatina no funcionamento normal do encéfalo.

Além disso, em situações de hiperexcitabilidade neuronal, a maquinaria fisiológica, na tentativa de manter os níveis de ATP constantes, aumenta o catabolismo de purinas, levando a, nos últimos passos, um aumento na atividade da enzima xantina oxidase, que tem como seus subprodutos os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio, além do ácido úrico (KANEMITSU et al., 1989). Assim, a creatina, por manter constantes os níveis de ATP, pela ação da enzima creatina quinase, reduz o catabolismo de purinas e, desta forma, também exerce uma ação antioxidante independente da mitocôndria, uma vez que controla o aumento na atividade da enzima xantina oxidase, induzido pela injeção de PTZ e, conseqüentemente, reduz a produção destas espécies reativas, também por esta via.

Sendo assim, acredita-se que os resultados apresentados nesta tese são de grande importância, pois tanto o treinamento físico aeróbico quanto a suplementação com creatina, além da combinação de ambos, podem constituir uma importante ferramenta no auxílio ao tratamento da epilepsia. É importante ressaltar que o treinamento físico, por si só, apresenta inúmeros benefícios, além dos aqui descritos, que incluem melhoras na autoestima, benefícios cardiovasculares, melhora na qualidade de vida em geral, entre outros. Apesar do medo, dos pacientes com epilepsia, de se inserirem em algum programa de treinamento físico, é altamente indicado que tenham o hábito de praticar alguma atividade, sempre acompanhados por profissionais capacitados. O medo de que a atividade física desencadeie crises é um mito, devido à falta de conhecimento e, muitas vezes, falta de controle e acompanhamento adequado do exercício físico. Embora mais estudos sejam necessários para complementar e compreender os efeitos e os mecanismos protetores do exercício físico e da creatina, acredita-se que ambos mereçam destaque nas discussões relativas às terapias complementares ao tratamento da epilepsia, devido ao seu comprovado potencial terapêutico.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta tese, pode-se concluir que:

6.1 Artigo I

- A suplementação oral crônica com creatina, o programa de treinamento físico aeróbico, assim como a combinação de ambos, estabilizaram os níveis de lactato;

- A suplementação oral crônica com creatina e o programa de treinamento físico aeróbico protegeram das alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ. Além disso, a combinação de ambos teve efeito anticonvulsivante aditivo;

- A suplementação oral crônica com creatina, o programa de treinamento físico aeróbico, assim como a combinação de ambos, protegeram contra a inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida por PTZ;

- A suplementação oral crônica com creatina, o programa de treinamento físico aeróbico, assim como a combinação de ambos, protegeram contra o estresse oxidativo induzido por PTZ.

- O treinamento físico aeróbico aumentou a atividade da SOD *per se*. Tanto a suplementação com creatina quanto o exercício físico também aumentaram o conteúdo de tióis não proteicos *per se*.

6.2 Artigo II

- A administração aguda de creatina protegeu contra a inibição da enzima Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PTZ;

- A administração aguda de creatina protegeu das alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ;

- A administração aguda de creatina controlou as alterações no metabolismo energético induzido por PTZ;

- A administração aguda de creatina protegeu contra o estresse oxidativo induzido por PTZ;

- A administração aguda de creatina aumentou o potencial de membrana mitocondrial *per se*.

6 BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, C. C. et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 795259, 2012.

ALFIERI, R. R. et al. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. **J Physiol**, v. 576, n. Pt 2, p. 391-401, 2006.

ALMEIDA, L. S. et al. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse**, v. 60, n. 2, p. 118-123, 2006.

AMES, A., 3RD. CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 34, n. 1-2, p. 42-68, 2000.

ANDRES, R. H. et al. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. **J Neurochem**, v. 95, n. 1, p. 33-45, 2005.

ANDRES, R. H. et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull**, v. 76, n. 4, p. 329-343, 2008.

ARIDA, R. M.; DE JESUS VIEIRA, A.; CAVALHEIRO, E. A. Effect of physical exercise on kindling development. **Epilepsy Res**, v. 30, n. 2, p. 127-132, 1998.

ARIDA, R. M. et al. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v. 37, n. 1, p. 45-52, 1999.

ARIDA, R. M. et al. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 814-822, 2007.

ARIDA, R. M. et al. Evaluation of physical exercise habits in Brazilian patients with epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 4, n. 5, p. 507-510, 2003a.

ARIDA, R. M. et al. Physical exercise in epilepsy: what kind of stressor is it? **Epilepsy Behav**, v. 16, n. 3, p. 381-387, 2009.

ARIDA, R. M. et al. Physical training does not influence interictal LCMRglu in pilocarpine-treated rats with epilepsy. **Physiol Behav**, v. 79, n. 4-5, p. 789-794, 2003b.

ARIDA, R. M. et al. The potential role of physical exercise in the treatment of epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 4, p. 432-435, 2010.

ATAULLAKHANOV, F. I.; VITVITSKY, V. M. What determines the intracellular ATP concentration. **Biosci Rep**, v. 22, n. 5-6, p. 501-511, 2002.

BENDER, A. et al. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. **Neurology**, v. 67, n. 7, p. 1262-1264, 2006.

BENDER, A. et al. Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with Parkinson disease. **Nutr Res**, v. 28, n. 3, p. 172-178, 2008.

BENEDETTI, M. G. et al. Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 45, n. 1, p. 53-59, 2009.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BOOTH, F. W.; CHAKRAVARTHY, M. V.; SPANGENBURG, E. E. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 399-411, 2002.

BOTHWELL, J. H. et al. Hypo-osmotic swelling-activated release of organic osmolytes in brain slices: implications for brain oedema in vivo. **J Neurochem**, v. 77, n. 6, 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. **J Membr Biol**, v. 185, n. 2, p. 157-164, 2002.

BRAISSANT, O. et al. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 86, n. 1-2, p. 193-201, 2001.

BREVARD, M. E. et al. Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, v. 47, n. 4, p. 745-754, 2006.

BROSNAN, J. T.; DA SILVA, R. P.; BROSNAN, M. E. The metabolic burden of creatine synthesis. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1325-1331, 2011.

BRUCE, A. J.; BAUDRY, M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 6, p. 993-1002, 1995.

BURKLEN, T. S. et al. The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. **J Biomed Biotechnol**, v. 2006, n. 3, p. 35936, 2006.

CANAFOGLIA, L. et al. Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders. **Neurology**, v. 56, n. 10, p. 1340-1346, 2001.

CARMODY, S.; BRENNAN, L. Effects of pentylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain. **Neurochem Int**, v. 56, n. 2, p. 340-344, 2010.

CARPIO, A.; HAUSER, W. A. Epilepsy in the developing world. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 9, n. 4, p. 319-326, 2009.

CARROLL, T. J. et al. Resistance training enhances the stability of sensorimotor coordination. **Proc Biol Sci**, v. 268, n. 1464, p. 221-227, 2001.

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. **Subcell Biochem**, v. 46, p. 99-118, 2007.

CLAPCOTE, S. J. et al. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 14085-14090, 2009.

CLAUSEN, T. Clinical and therapeutic significance of the Na⁺,K⁺ pump*. **Clin Sci (Lond)**, v. 95, n. 1, p. 3-17, 1998.

CLAUSEN, T.; VAN HARDEVELD, C.; EVERTS, M. E. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. **Physiol Rev**, v. 71, n. 3, p. 733-774, 1991.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.

DE SARRO, G. et al. Azirino[1, 2-d][1, 4]benzodiazepine derivatives and related 1,4-benzodiazepines as anticonvulsant agents in DBA/2 mice. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 7, p. 1155-1162, 1996.

DISHMAN, R. K. et al. Physical self-concept and self-esteem mediate cross-sectional relations of physical activity and sport participation with depression symptoms among adolescent girls. **Health Psychol**, v. 25, n. 3, p. 396-407, 2006.

DOLDER, M. et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17760-17766, 2003.

DUBBERKE, R.; VASILETS, L. A.; SCHWARZ, W. Inhibition of the Na⁺,K⁺ pump by the epileptogenic pentylenetetrazole. **Pflugers Arch**, v. 437, n. 1, p. 79-85, 1998.

DUCRAY, A. D. et al. Creatine promotes the GABAergic phenotype in human fetal spinal cord cultures. **Brain Res**, v. 1137, n. 1, p. 50-57, 2007a.

DUCRAY, A. D. et al. Creatine treatment promotes differentiation of GABAergic neuronal precursors in cultured fetal rat spinal cord. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 9, p. 1863-1875, 2007b.

DUDEK, F. E. et al. Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells associated with mossy fiber sprouting. **Hippocampus**, v. 4, n. 3, p. 259-265, 1994.

ELGER, C. E. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 5, p. 9-15, 2003.

ELLIS, A. C.; ROSENFELD, J. The role of creatine in the management of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. **CNS Drugs**, v. 18, n. 14, p. 967-980, 2004.

ERAKOVIC, V. et al. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol--induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.

ERIKSEN, H. R. et al. Physical exercise in women with intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 35, n. 6, p. 1256-1264, 1994.

FERRANTE, R. J. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 4389-4397, 2000.

FIGHERA, M. R. et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. **Neurobiol Dis**, v. 22, n. 3, p. 611-623, 2006.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, 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.

FUJISAWA, H. et al. Movement of Radioactive Calcium in Brain Slices and Influences on It of Protoveratrine Ouabain Potassium Chloride and Cocaine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 327-&, 1965.

FUJITA, K. et al. Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 324256, 2012.

FURIAN, A. F. et al. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochem Int**, v. 50, n. 1, p. 164-171, 2007.

GALLANTI, A. et al. A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures. **J Neurol Sci**, v. 273, n. 1-2, p. 123-126, 2008.

GLAUSER, T. et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1094-1120, 2006.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

GOMES, E. C.; SILVA, A. L.; DE OLIVEIRA, M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 756132, 2012.

GOMES, M. M. History of epilepsy: a epistemologic point of view. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 3, 2006.

GREENHAFF, P. L. Creatine supplementation: recent developments. **Br J Sports Med**, v. 30, n. 4, p. 276-277, 1996.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res**, v. 1288, p. 105-115, 2009.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 141-149, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HAUSER, W. A.; ANNEGERS, J. F.; ROCCA, W. A. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. **Mayo Clin Proc**, v. 71, n. 6, p. 576-586, 1996.

HAUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. **Am J Physiol**, v. 267, n. 3 Pt 1, p. E343-355, 1994.

HEISE, J. et al. Exercise Training Results in Positive Outcomes in Persons with Epilepsy. **Clinical Exercise Physiology**, v. 4, p. 79-84, 2002.

HERSCH, S. M. et al. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²'dG. **Neurology**, v. 66, n. 2, p. 250-252, 2006.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 58-65, 2008.

JAGER, R. et al. Comparison of new forms of creatine in raising plasma creatine levels. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 4, p. 17, 2007.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, p. 333-337., 1995.

JENSEN, F. E. et al. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. **Ann Neurol**, v. 29, n. 6, p. 629-637, 1991.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**, v. 29, n. 6, p. 373-386, 2000.

JONES, T. A. et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. **J Neurosci**, v. 19, n. 22, p. 10153-10163, 1999.

JURKAT-ROTT, K. et al. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. **Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1857-1861, 2004.

KANEMITSU, H. et al. Allopurinol inhibits uric acid accumulation in the rat brain following focal cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 499, n. 2, p. 367-370, 1989.

KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. **Prog Brain Res**, v. 127, p. 35-48, 2000.

KIM, D. W. et al. Effects of creatine and beta-guanidinopropionic acid and alterations in creatine transporter and creatine kinases expression in acute seizure and chronic epilepsy models. **BMC Neurosci**, v. 11, p. 141, 2010.

KOGA, Y. et al. Brain creatine functions to attenuate acute stress responses through GABAergic system in chicks. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 65-71, 2005.

KOHL, Z. et al. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, v. 1155, p. 24-33, 2007.

KRAMER, A. F. et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-419, 1999.

KRAMER, G. Epilepsy in the elderly: some clinical and pharmacotherapeutic aspects. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 3, p. 55-59, 2001.

KUPFERBERG, H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 4, p. 7-12, 2001.

KWAN, P. et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010.

LAURIN, D. et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, v. 58, n. 3, p. 498-504, 2001.

LAWLER, J. M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 1, p. 47-52, 2002.

LEES, G. J. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 120, 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, n. 4, p. 675-683, 2001.

LIANG, C. S. et al. Allopurinol for treatment-resistant schizophrenia and epilepsy: a case report. **Pharmacopsychiatry**, v. 43, n. 6, p. 233-234, 2010.

LIANG, L. P.; PATEL, M. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in Sod2(-/+) mice. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 5, p. 542-554, 2004.

LIU, Y. F. et al. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, n. 1, p. 81-89, 2008.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011.

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. **J Neurophysiol**, v. 74, n. 2, p. 841-848, 1995.

MAGNI, D. V. et al. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Res**, v. 1185, p. 336-345, 2007.

MAK, C. S. et al. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 571-585, 2009.

MATSUMOTO, H.; MARSAN, C. A. Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations. **Exp Neurol**, v. 9, p. 286-304, 1964.

MCARDLE, W.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MIKATI, M. A. et al. Effects of creatine and cyclocreatine supplementation on kainate induced injury in pre-pubescent rats. **Brain Inj**, v. 18, n. 12, p. 1229-1241, 2004.

MODY, I.; LAMBERT, J. D.; HEINEMANN, U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. **J Neurophysiol**, v. 57, n. 3, 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. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

MOTA, B. C. et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. **Neurotox Res**, v. 21, n. 2, p. 175-184, 2012.

NAKKEN, K. O. et al. Does physical exercise influence the occurrence of epileptiform EEG discharges in children? **Epilepsia**, v. 38, n. 3, p. 279-284, 1997.

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.

O'GORMAN, E. et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett**, v. 414, n. 2, p. 253-257, 1997.

OHTSUKI, S. et al. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, n. 11, p. 1327-1335, 2002.

OLIVEIRA, M. S. et al. Epileptiform activity in the limbic system. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 565-593, 2011.

OLIVEIRA, M. S. et al. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 200-204, 2008.

OMS, O. M. D. S. **Epilepsy: Fact sheet number 999**. 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> >. Acesso em: 19/01/2013.

PAN, J. W.; TAKAHASHI, K. Cerebral energetic effects of creatine supplementation in humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 4, p. R1745-1750, 2007.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 1951-1962, 2004.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 161-176, 2001.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A.; HOCHHAUS, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, n. 6, p. 557-574, 2003.

PETRUSHANKO, I. Y. et al. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 4, p. R916-925, 2006.

PETRUSHANKO, I. Y. et al. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. **J Gen Physiol**, v. 130, n. 4, p. 389-398, 2007.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. **Models of Seizure and Epilepsy**. USA: Elsevier, 2006.

POWELL, K. E.; PAFFENBARGER, R. S., JR. Workshop on Epidemiologic and Public Health Aspects of Physical Activity and Exercise: a summary. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 118-126, 1985.

PRASS, K. et al. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 3, p. 452-459, 2007.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr Rev**, v. 24, n. 1, p. 78-90, 2003.

RABCHEVSKY, A. G. et al. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 7, p. 659-669, 2003.

RADAK, Z. et al. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc Immunol Rev**, v. 7, p. 90-107, 2001.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 153-159, 2008.

RAMBO, L. M. et al. Creatine increases hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. **Brain Res Bull**, v. 88, n. 6, p. 553-559, 2012.

RAMOS, J. J. **Os exercícios físicos na história e na arte: do homem primitivo aos nossos dias**. 1 ed. São Paulo: IBRASA, 1982.

RAUCA, C.; ZERBE, R.; JANTZE, H. Formation of free hydroxyl radicals after pentylentetrazol-induced seizure and kindling. **Brain Res**, v. 847, n. 2, p. 347-351, 1999.

REISS, J. I. et al. Chronic activity wheel running reduces the severity of kainic acid-induced seizures in the rat: possible role of galanin. **Brain Res**, v. 1266, p. 54-63, 2009.

RIBEIRO, M. C. et al. alpha-Tocopherol protects against pentylentetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res**, v. 66, n. 1-3, p. 185-194, 2005.

ROSENFELD, J. et al. Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. **Amyotroph Lateral Scler**, v. 9, n. 5, p. 266-272, 2008.

ROYES, L. F. et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 1079-1090, 2003.

ROYES, L. F. et al. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 136-144, 2006.

ROYES, L. F. et al. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. **Neurochem Int**, v. 53, n. 1-2, p. 33-37, 2008.

RYU, H. et al. The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. **Pharmacol Ther**, v. 108, n. 2, p. 193-207, 2005.

SAKELLARIS, G. et al. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **J Trauma**, v. 61, n. 2, p. 322-329, 2006.

SAKELLARIS, G. et al. Prevention of traumatic headache, dizziness and fatigue with creatine administration. A pilot study. **Acta Paediatr**, v. 97, n. 1, p. 31-34, 2008.

SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-170, 2003.

SANDER, J. W.; SHORVON, S. D. Epidemiology of the epilepsies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 433-443, 1996.

SATO, E. et al. Kinetic analysis of reactive oxygen species generated by the in vitro reconstituted NADPH oxidase and xanthine oxidase systems. **J Biochem**, v. 150, n. 2, p. 173-181, 2011.

SCHEFF, S. W.; DHILLON, H. S. Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. **Neurochem Res**, v. 29, n. 2, p. 469-479, 2004.

SCHLATTNER, U.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 164-180, 2006.

SCHNEIDER OLIVEIRA, M. et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, n. 4, p. 721-728, 2004.

SENANAYAKE, N.; ROMAN, G. C. Epidemiology of epilepsy in developing countries. **Bull World Health Organ**, v. 71, n. 2, p. 247-258, 1993.

SESTILI, P. et al. Creatine as an antioxidant. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1385-1396, 2011.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 837-849, 2006.

SETKOWICZ, Z.; MAZUR, A. Physical training decreases susceptibility to subsequent pilocarpine-induced seizures in the rat. **Epilepsy Res**, v. 71, n. 2-3, p. 142-148, 2006.

SHEFNER, J. M. et al. A clinical trial of creatine in ALS. **Neurology**, v. 63, n. 9, p. 1656-1661, 2004.

SHIN, E. J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochem Int**, v. 59, n. 2, p. 122-137, 2011.

SHOFFNER, J. M. et al. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. **Cell**, v. 61, n. 6, p. 931-937, 1990.

SORA, I. et al. The cloning and expression of a human creatine transporter. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 204, n. 1, p. 419-427, 1994.

SOUZA, M. A. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 811-823, 2009.

SPEER, O. et al. Creatine transporters: a reappraisal. **Mol Cell Biochem**, v. 256-257, n. 1-2, p. 407-424, 2004.

SPEISMAN, R. B. et al. Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. **Brain Behav Immun**, 2012.

ST-PIERRE, J. et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397-408, 2006.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol**, v. 44, p. 681-693, 1986.

STEINER, J. L. et al. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. **J Appl Physiol**, v. 111, n. 4, p. 1066-1071, 2011.

STRINE, T. W. et al. Psychological distress, comorbidities, and health behaviors among U.S. adults with seizures: results from the 2002 National Health Interview Survey. **Epilepsia**, v. 46, n. 7, p. 1133-1139, 2005.

SURGES, R. et al. Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. **Nat Rev Neurol**, v. 5, n. 9, p. 492-504, 2009.

TADA, H. et al. Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 32, n. 2, p. 279-283, 1991.

TASKER, J. G.; DUDEK, F. E. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. **Neurochem Res**, v. 16, n. 3, p. 251-262, 1991.

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

THOMAS, S. V.; NAIR, A. Confronting the stigma of epilepsy. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 14, n. 3, p. 158-163, 2011.

TILLERSON, J. L. et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

TOGHA, M. et al. Allopurinol as adjunctive therapy in intractable epilepsy: a double-blind and placebo-controlled trial. **Arch Med Res**, v. 38, n. 3, p. 313-316, 2007.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M. et al. Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43178, 2012.

TOME, A. R.; FENG, D.; FREITAS, R. M. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochem Res**, v. 35, n. 4, p. 580-587, 2010.

VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 283-290, 2009.

VANCINI, R. L. et al. Cardiorespiratory and electroencephalographic responses to exhaustive acute physical exercise in people with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 19, n. 3, p. 504-508, 2010.

VANCINI, R. L. et al. Epilepsia e atividade física: estudos em humanos e animais. **Motriz**, v. 14, p. 196-206, 2008.

VELIOGLU, S. K. et al. Status epilepticus after stroke. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1169-1172, 2001.

VIELHABER, S. et al. Hippocampal N-acetyl aspartate levels do not mirror neuronal cell densities in creatine-supplemented epileptic rats. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2292-2300, 2003.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1389-1394, 2002.

WALCZAK, T. S. Neocortical temporal lobe epilepsy: characterizing the syndrome. **Epilepsia**, v. 36, n. 7, p. 633-635, 1995.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, n. 6, p. 449-455, 2010.

WILLIAMS, M. H.; BRANCH, J. D. Creatine supplementation and exercise performance: an update. **J Am Coll Nutr**, v. 17, n. 3, p. 216-234, 1998.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

WYSS, M.; SCHULZE, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 243-260, 2002.

YACUBIAN, E. M. T. **Epilepsia, da antiguidade ao Segundo milênio: saindo das sombras**. São Paulo, Brasil: Lemos Editorial, 2000.

ZAGNONI, P. G. et al. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p. 107-112, 1994.

ZHU, S. et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. **J Neurosci**, v. 24, n. 26, p. 5909-5912, 2004.