UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CARLOS ROBERTO PORTO DECHANDT

**Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação
com as crises epiléticas em *Wistar audiogenic rats* (WAR)**

Ribeirão Preto – SP

2018

CARLOS ROBERTO PORTO DECHANDT

**Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação
com as crises epiléticas em *Wistar audiogenic rats* (WAR)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Luciane Carla Alberici

Ribeirão Preto – SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação com as crises epiléticas em *Wistar audiogenic rats* (WAR)

DECHANDT, Carlos Roberto Porto

Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação com as crises epiléticas em wistar audiogenic rats (WAR). Ribeirão Preto, 2018. 117 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

1. Mitocôndria;
2. Epilepsia audiogênica;
3. *Wistar audiogenic rats* - WAR;
4. Dinitrofenol - DNP
5. N-acetilcisteína – NAC;
6. Espécies Reativas de Oxigênio – EROs.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: DECHANT, Carlos Roberto Porto

Título: Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação com as crises epiléticas em *Wistar audiogenic rats* (WAR).

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas.

Romanos 11:36a

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pelo dom da vida, pela oportunidade de correr atrás dos meus objetivos, e pela misericórdia sobre a minha vida.

Aos meus pais, **Carlos R. Dechandt** e **Margareth S. Porto**, pelos incentivos, apoio, pelas horas no telefone me aguentando quando eu achava que não iria suportar.

As minhas irmãs, **Andressa R. P. Dechandt Otahara** e **Helena Vitória Pereira da Costa**, pelo apoio e pelas brigas que nos fazem ser mais próximos, ao meu cunhado, **Diogo Rosa Otahara de Campos**, que me proveu o conforto em saber que minha família estava bem quando eu não pude estar presente. A minha linda sobrinha **Alice Dechandt Otahara**, pelo carinho que recebi em todas as vezes que fui visita-la.

A Professora Dra. **Luciane Carla Alberici**, por abrir as portas de seu laboratório e da USP para mim, pela confiança depositada, por ensinar a trabalhar duro para que se tenha pesquisas de qualidade superior, pela paciência e por todo conhecimento científico que me proveu desde 2014.

Ao Professor Dr. **Norberto Garcia Cairasco** e **José A. Cortes de Oliveira**, por terem me fornecido os animais para desenvolvimento desta tese, além do professor Dr. **Norberto Garcia Cairasco**, ter me co-orientado meu projeto de pesquisa.

Ao Professor Dr. **Vitor Marcel Faça**, pela oportunidade de me permitir realizar as análises em seu laboratório, e ao mestre **Guilherme Paupério Lanfredi** pela ajuda na bancada e paciência em explicar a metodologia.

Aos colegas de laboratório, **Anderson de O. Souza**, **Anderson Vulczak**, **Carlos Couto**, **Jonathas R. dos Santos**, **Igor H. Sampaio**, e **Henrique Angelo M. Cunha**, por terem me fornecido um ambiente de extrema estimulação para amadurecimento científico; em especial gostaria de agradecer aos colegas de laboratório mais próximos (que na verdade são amigos), **Gustavo Ferrari** e **Simone S. Tavares**, pelas horas de conversas, pelas ajudas na bancada, pelos incentivos e pelo apoio nas horas que pareciam que nada iria dar certo.

As técnicas de laboratório **Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini** e **Luciana Ceribelli**, e pós-doc **Larissa Marchi**, pelos momentos de descontração, pelos conselhos.

Aos meus amigos, **Vinicius Ourives**, **Jose Junior Franco** e **Rodrigo M. de Oliveira**, que me apoiaram intensamente no início desta jornada. Aos meus amigos, **Frank Lucarini**, **Israel Souza**, **Anderson Ferreira** e **Soraya Saab** que estiveram juntos durante esses quatro anos.

Aos funcionários da **FCFRP** e **FMRP**, em especial a **Maria Ivone Campos**, que sempre me ajudou quando precisei.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por fomentar minha bolsa de estudos durante esse período.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABELAS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIACÕES	7
INTRODUÇÃO.....	11
EPILEPSIA	13
EPILEPSIA AUDIOGÊNICA	14
LINHAGEM WAR	15
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E LÍPIDEOS EM WAR.....	Erro! Indicador não definido.
SINALIZAÇÃO DO ATP / BALANÇO ENERGÉTICO NO SNC.....	17
METABOLISMO CEREBRAL.....	20
BIOENERGÉTICA DE CRISES EPILÉTICAS PROLONGADAS	22
MITOCÔNDRIA	23
BIOGÊNESIS MITOCONDRIAL.....	24
mTOR E EPILEPSIA.....	26
ESTRESSE OXIDATIVO	27
OBEJETIVOS	29
OBJETIVOS GERAIS	29
OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
ANIMAIS.....	30
INVESTIGAÇÃO DA INGESTÃO HÍDRICA E ALIMENTAR.....	30
INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO CORPORAL ATRAVÉS DE CALORIMETRIA INDIRETA.....	31
SACRIFÍCIO E REMOÇÃO DE TECIDOS E FLUIDOS	31
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	31
AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FÍSICO – TESTE INCREMENTAL DE CARGA	32
AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA	32
Kindling AUDIOGÊNICO.....	32
ANÁLISES PLASMÁTICAS.....	33
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FECAL	33
ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIA DE FÍGADOS.....	34

MEIOS DE ENSAIO	35
CONSUMO DE OXGENIO	35
ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	35
DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX.....	36
QUANTIFICAÇÃO DE RNAm	37
QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	39
ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE	40
ATIVIDADE DA CATALASE	41
ATIVIDADE DA SUPEROXIDISMUTASE – SOD.....	41
DETERMINAÇÃO DE LACTATO	41
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÃO.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	81
ANEXOS.....	103
Anexo 1: Certificado de autorização para experimentação animal	103
Anexo 2: Lista das proteínas analisadas no LC-MS/MS.....	105
Anexo 3: Símbolo dos aminoácidos utilizados para ilustrar a sequência de aminoácidos do peptídeo precursor e íons fragmentado do anexo 2.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da hidrólise e síntese do ATP intracelular e extracelular pelas endonucleotidasas, e a formação de seus metabólitos.....	19
Figura 2: Oxidação de substratos energéticos no sistema nervoso central.....	21
Figura 3: Medida do (A) volume de O ₂ inspirado (VO ₂), (B) volume de CO ₂ expirado (VCO ₂), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) de animais Wistar e da cepa WAR. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar nos respectivos períodos; Média ± erro padrão. n = 10.....	42
Figura 4: Medida da (A) movimentação horizontal e (B) movimentação vertical de animais Wistar e da cepa WAR. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01, nos respectivos períodos; Média ± erro padrão. n = 10.	43
Figura 5: Medida diária da (A) ingestão alimentar, (B) ingestão hídrica, (C) massa fecal e (D) volume urinário de animais Wistar e WAR mensurados durante sete dias. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar; Média ± erro padrão. n = 5.....	44
Figura 6: Taxa de desaparecimento da glicose sérica (Kitt), referente ao teste de tolerância a insulina. Análise estatística: Teste t-Student. Média ± erro padrão. n = 7.	46
Figura 7: Taxas respiratórias de biopsias de fígado (A), músculo sóleo (B) e coração (C) de animais Wistar e WAR, nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L) e ETS (E). Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar; Média ± erro padrão. n = 5.	50
Figura 8: Estado REDOX hepático e musculares – sóleo e coração - de animais da cepa WAR e Wistar. (A) produção de H ₂ O ₂ , (B) razão GSH/GSSG e (C) proteína carbonilada. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar; **P<0,01 vs Wistar. Média ± erro padrão. n = 8.....	52
Figura 9: Quantificação da enzima citrato sintase através da mensuração de sua atividade, no fígado e músculos (sóleo e cardíaco) de animais da cepa WAR e Wistar. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar; ***P<0,001 vs Wistar. Média ± erro padrão. n = 8.....	53
Figura 10: Expressão relativa de PGC1α:β-actina nos tecidos hepático e musculares (sóleo e cardíaco) de animais da cepa WAR e Wistar. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar; Média ± erro padrão. n = 5.	53
Figura 11: (A) Valores dos estados respiratórios de mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar nos estados OXPHOS (P), LEAK (L), (B) razão ADP/O; (C) produção de H ₂ O ₂ . Análise estatística: Teste t-Student. *P<0,05 vs Wistar; Média ± erro padrão. n = 5.	54
Figura 12: Quantificação relativa das proteínas envolvidas no processo de fusão/fissão mitocondrial, composição do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons, OXPHOS, em amostras de mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar. mitofusina 2	

(Mfn2), mitofusina 1 (Mfn1), *Optic Atrophy-1* (OPA 1), Proteína mitocondrial de fissão 1 (Fis1), malato desidrogenase 2 (M.D.), quinona oxidoreductase 1 (NQO1), quinona oxidoreductase 2 (NQO2), ATPase transportadora de sódio / potássio, proteína de tipo alfa (ATP1A), Subunidade beta, ATP sintase (ATP5B), proteína de desacoplamento 1 (UCP-1), proteína de desacoplamento 2 (UCP-2), proteína de desacoplamento 3 (UCP-3), proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 1 (VDAC 1), Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 2 (VDAC 2), Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 3 (VDAC 3). Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar, * $P < 0,01$ vs Wistar, *** $P < 0,001$ vs Wistar; média $\pm$ erro padrão. $n = 6$ 55

Figura 13: Quantificação relativa das proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e proteínas, em amostras de lisado hepático de animais da cepa WAR e Wistar. Frutose-1,6-Bisfosfatase 1 (FBP1), Fosfoenolpiruvato carboxikinase 1 (PCK1), Glicerol-3-fosfato desidrogenase 1 (GPD1), Piruvato carboxilase (PC), Transaminase glutâmica pirúvica (GPT), Glutamato Oxalacetato Transaminase 1 (GOT1), Glutamato Oxalacetato Transaminase 2 (GOT2), *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar, * $P < 0,01$ vs Wistar, *** $P < 0,001$ vs Wistar; média $\pm$ erro padrão. $n = 6$ 56

Figura 14: Índices de severidade categorizado (ISc) das crises mesencefálicas dos animais WAR submetidos ao *kindling* audiogênico ($n = 8$) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. 57

Figura 15: Taxas respiratórias de biopsias de hipocampo(A) e córtex (B) de animais Wistar e WAR, com 80 dias de vidas após serem submetidos ao *kindling* audiogênico, nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L), ETS (E). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ 58

Figura 16: Quantificação da enzima citrato sintase através da mensuração de sua atividade, em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem submetidos ao *kindling* audiogênico. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ 60

Figura 17: Estado REDOX de biopsias cerebrais (Hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem submetidos ao *kindling* audiogênico. (A) razão GSH/GSSG; (B) atividade da catalase; (C) atividade da superoxidismutase (SOD) e (D) proteína carbonilada. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ 61

Figura 18: Quantificação de lactato, em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem submetidos ao *kindling* audiogênico. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ 62

Figura 19: Medida do (A) volume de O₂ inspirado (VO₂), (B) volume de CO₂ expirado (VCO₂), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-

acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 64

Figura 20: Medida do (A) movimentação horizontal, (B) movimentação vertical de animais da cepa WAR após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 64

Figura 21: Índices de severidade categorizado (ISc) das crises mesencefálicas dos animais WAR submetidos antes e após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 65

Figura 22: Taxas respiratórias de biopsias de hipocampo(A) e córtex (B de animais da cepa após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC), nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L), ETS (E). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 66

Figura 23: Quantificação da enzima citrato sintase através da mensuração de sua atividade, em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 67

Figura 24: Estado REDOX de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). (A) produção de H₂O₂, (B) razão GSH/GSSG e (C) proteína carbonilada. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 68

Figura 25: Quantificação de lactato, em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 69

Figura 26: Expressão relativa de RNAm em relação a β -actina na região do hipocampo de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 70

Figura 27: Expressão relativa de RNAm em relação a β -actina na região do córtex de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. n = 7..... 71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Índice de gravidade de crises mesencefálicas segundo Rossetti et al. (2006).	33
Tabela 2: Sequencia dos primers utilizados na quantificação RT-PCR.	38
Tabela 3: Quantificação da composição fecal e urinaria de animais Wistar e da cepa WAR.	44
Tabela 4: Parâmetros avaliados para mensurar a resistência física diante do teste incremental de carga.	44
Tabela 5: Valores de lipídios circulantes, ureia, enzimas de dano hepático, células sanguíneas e glicemia de animais Wistar e WAR.	47
Tabela 6: Massa relativa dos tecidos e índice de Lee, de animais Wistar e WAR.	48
Tabela 7: Composição dos tecidos hepático e musculares – sóleo e coração animais Wistar e WAR.	51
Tabela 8: Razões respiratórias de biopsias de fígado, músculos sóleo e cardíaco e mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar.	49
Tabela 9: Valores referente ao fluxo de controle respiratório de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e controle, com 80 dias de vida; após serem submetidas ao kindling audiogênico.	59
Tabela 10: Massa relativa dos tecidos de animais WAR tratados com DNP ou NAC...	63
Tabela 11: Valores de lipídios circulantes, ureia, enzimas de dano hepático e glicemia de animais WAR tratados com DNP ou NAC.	65
Tabela 12: Valores referente ao fluxo de controle respiratório de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC).	66

RESUMO

DECHANDT, C. R. P., **Estudo do metabolismo energético mitocondrial e sua relação com as crises epiléticas em *Wistar audiogenic rats* (WAR)** 117f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: *Wistar Audiogenic Rats* (WAR) é modelo experimental desenvolvido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para estudo da epilepsia, entretanto, a seleção genética em resposta aos comportamentos de crises audiogênicas também trouxe à tona alterações no metabolismo energético nesses animais. Dois estudos são relevantes deste ponto de vista, no primeiro Botion e Doretto observaram que WAR após serem estimulados apresentam: (a) valores de glicemia maior em relação ao Wistar; (b) aumento no lactato circulante - o que pode indicar deficiência na fosforilação oxidativa (OXPHOS); (c) aumento da atividade adrenérgica, induzindo dessensibilização da via lipolítica β -adrenérgica no tecido adiposo epididimal. Pereira e colaboradores investigando o metabolismo de carboidratos relataram: (a) aumento na via glicólica; (b) translocação de GLUT4 aumentada no músculo gastrocnêmico e (c) redução nos níveis de glicogênio muscular. **Objetivo:** Diante desses achados o presente estudo tem como objetivo elucidar o metabolismo energético mitocondrial e sua relação com as crises epiléticas induzidas por estímulos sonoros. **Resultados:** Através de análises comportamentais e calorimetria indireta, relatamos que WAR possui perfil ansiogênico e tem preferência em oxidar aminoácidos; utilizando biopsias de tecido hepático, músculo esquelético e cardíaco, observamos maior densidade mitocondrial, acompanhada de maior geração de H_2O_2 e como consequência maior estresse oxidativo; na busca para elucidar com maior destreza, realizamos isolamento da fração mitocondrial do tecido hepático, e concluímos que não há maior geração de H_2O_2 por mitocôndria, porém há um enriquecimento proteico (algumas proteínas funcionais – como as envolvidas na OXPHOS- e outras não-funcionais – como as UCPs), além de relatarmos maiores níveis de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial, desse modo podemos concluir que WAR possuem maior densidade mitocondrial e mitocôndrias com maior eficiência; o mesmo perfil mitocondrial foi observado no tecido cerebral. Após tratamento com DNP e NAC, observamos redução do estresse oxidativo no tecido cerebral, porém apenas NAC reduziu a severidade da crise, assim concluímos que o suave desacoplamento induzido por DNP não é capaz de reduzir de forma significativa a severidade da crise, porém a inibição da glicólise pelo NAC, alterou a bioenergética cerebral é capaz a reduzir a severidade da crise, deixando evidenciado que o metabolismo energético tem papel essencial/relevante na crise epilética induzida por estímulos sonoros em WAR, enquanto o estresse oxidativo tem papel secundário.

Palavras-chaves: Mitocôndria; *Wistar audiogenic rats* - WAR; espécies reativas de oxigênio – EROs; Epilepsia audiogênica, 2,4-dinitrofenol – DNP; N-acetilcisteína – NAC.

ABSTRACT

DECHANDT, C. R. P., **Study of mitochondrial energy metabolism and its relationship with epileptic seizures in Wistar audiogenic rats (WAR)** 117f. Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Wistar Audiogenic Rats (WAR) is an experimental model developed in the Ribeirão Preto Medical School, for the study of epilepsy, however, the genetic selection in response to the behaviors of audiogenic crisis also brought up changes in energy metabolism in these animals. Two studies are relevant from this point of view, in the first Botion and Doretto observed that WAR after being stimulated present: (a) higher blood glucose values in relation to the Wistar; (b) Increase in circulating lactate-which may indicate deficiency in oxidative phosphorylation (OXPHOS); (c) Increased adrenergic activity. Pereira and collaborators investigating the metabolism of carbohydrates reported: (a) increase in glycolysis; (b) Translocation of GLUT4 increased in gastrocnemius muscle and (c) reduction in muscle glycogen levels.

Objective: In the face of these findings, the present study aims to elucidate the mitochondrial energy metabolism and its relation to the epileptic crises induced by sound stimuli. **Results:** Through behavioral analysis and indirect calorimetry, we report that WAR has reduced exploratory activity and has preference to oxidize amino acids; Using biopsies of liver tissue, skeletal and cardiac muscles, we observe greater mitochondrial density, accompanied by greater generation of H_2O_2 and as a result of greater oxidative stress; in the search to elucidate with greater dexterity, we perform isolation of the mitochondrial fraction of the hepatic tissue, and we conclude that there is no greater generation of H_2O_2 by mitochondria, but there is a protein enrichment (some functional proteins – such as those involved in OXPHOS - and other non-functional ones – such as UCPs), in addition to reporting higher levels of proteins involved in mitochondrial dynamics, so we can conclude that WAR has greater mitochondrial density and mitochondria more efficiently; the same mitochondrial profile was observed in the brain tissue. After treatment with DNP and NAC, we observed reduction of oxidative stress in the brain tissue, but only NAC reduced the severity of the crisis, so we conclude that the smooth decoupling induced by DNP is not able to significantly reduce the severity of the crisis, however the inhibition of glycolysis by the NAC, altered the brain bioenergetics is able to reduce the severity of the crisis, leaving evidence that the energy metabolism has essential/relevant role in the epileptic crisis induced by sound stimuli in WAR, while oxidative stress has secondary role.

Key words: mitochondria; Wistar audiogenic Rats-WAR; Reactive oxygen species – EROs; Audiogenic Epilepsy, 2,4-Dinitrophenol – DNP; N-Acetylcysteine – NAC.

LISTA DE ABREVIACÕES

2DG: 2-desoxi-D-glicose

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AKT: proteína quinase B

ALT: alanina aminotransferase

AMP: monofosfato de adenosina

AMPK: proteína quinase ativada por AMP

AST: aspartato-aminotransferase

ATP: trifosfato de adenosina

ATP1A: ATPase transportadora de sódio / potássio, proteína de tipo alpha

ATP5B: Subunidade beta, ATP sintase

Ca⁺²: íon cálcio

CCCP: carbonilcianeto-m-clorofenilidrazina

CI: complexo NADH-Q oxidorreductase

CII: succinato desidrogenase

CIII: complexo citocromo *c* oxidorreductase

CIV: complexo Citocromo *c* oxidase

CK: ciclo de Krebs

CTE: cadeia transportadora de elétrons

Deptor: proteína de interação que contém o domínio mTOR

DNAm: DNA mitocondrial

DNP: 2,4-dinitrofenol

EE: gasto energético total

EROs: espécies reativas de oxigênio

FBP1: Frutose-1,6-Bisfosfatase 1

Fis1: Proteína mitocondrial de fissão 1

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FPM: força próton-motiva

G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase

GAL: glutamato-amônia ligase

GDH: glutamato-desidrogenase

GERPs: *Genetic Epilepsy Prone Rats*

GLS: glutaminase

GLUT-1: transportador de glicose 1

GLUT-3: transportador de glicose 3

GLUT-4: transportador de glicose 4

GOT1: Glutamato Oxalacetato Transaminase 1

GOT2: Glutamato Oxalacetato Transaminase 2

GPD1: Glicerol-3-fosfato desidrogenase 1

GPT: Transaminase glutâmica pirúvica

GS: Glutathione sintetase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

HK: Hexokinase-1

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HRP: *Horseradish peroxidase*

K_{itt}: constante de decaimento da glicose

KMs: *Krushinsky-Molodkina rats*

LDH-1: lactato desidrogenase 1

LDH-5: lactato desidrogenase 5

Ldha: Lactato desidrogenase A

Ldhb: Lactato desidrogenase B

LNNE: Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental

M.D.: malato desidrogenase 2

MCT: transportadores de monocarboxilatos

MCT-1: transportador de monocarboxilatos isoforma 1

MCT-2: transportador de monocarboxilatos isoforma 2

Mfn1: mitofusina 1

Mfn2: mitofusina 2

mitoK_{ATP}: canais de K⁺ sensíveis a ATP

mLST8: proteína GTPase subunidade β

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1: complexo 1 da mTOR

mTORC2: complexo 2 da mTOR

NAC: N-acetilcisteína

NQO1:quinona oxidoreductase 1

NQO2: quinona oxidoreductase 2

NRF1: fator respiratório nuclear 1

NRF2: fator respiratório nuclear 2

OPA 1: *Optic Atrophy-1*

OXPHOS: fosforilação oxidativa

PC: Piruvato carboxilase

PCK1: Fosfoenolpiruvato carboxikinase 1

PFK: Fosfofrutoquinase

PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PK: Piruvato-kinase

PKC: proteína quinase C

Pklr: *pyruvate kinase L/R*

Ppargc1a: PPARG coactivator 1 alpha

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

PTZ: pentilenotetrazol

Raptor: proteína regulatória associada a TOR

RQ: coeficiente respiratório

SE: *status epilepticus*

SGK1:proteína quinase regulada por glucocorticóides 1

SNC: sistema nervoso central

SIRT1: sirtuina 1

Slc16a1: *solute carrier family 16 member 1*

Slc16a3: *solute carrier family 16 member 3*

Slc16a7: *solute carrier family 16 member 7*

Slc1a2: *solute carrier family 1 member 2*

Slc1a3: *solute carrier family 1 member 3*

Slc2a1: *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1*

Slc2a3: *solute carrier family 2 member 3*

SNC: sistema nervoso central

UCP's: proteínas desacopladoras

UCP-1: proteína desacopladora 1

UCP-2: proteína desacopladora 2

UCP-3: proteína desacopladora 3

VCO₂: volume de gás carbônico produzido

VDAC 1: proteína de canal seletivo aniônico voltagem-dependente de 1

VDAC 2: Proteína de canal seletivo aniônico voltagem-dependente de 2

VDAC 3: Proteína de canal seletivo aniônico voltagem-dependente de 3

VDCC: canais de Ca⁺² voltagem-dependente

VO₂: volume de oxigênio consumido

VPF: via das pentoses fosfato

WAR: *Wistar Audiogenic Rats*

ΔΨ: potencial de membrana

INTRODUÇÃO

Epilepsia é por definição uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro não causada por febre, drogas ou distúrbios metabólicos. Durante alguns segundos ou minutos, uma parte do cérebro emite sinais incorretos que podem ficar restritos a um hemisfério (crise parcial) ou se espalharem pelos dois hemisférios cerebrais (crise generalizada) (FISHER et al., 2017).

Apesar de haver poucos estudos sobre prevalência/incidência de epilepsia no Brasil, cinco estudos foram realizados em cidades grandes ou médio porte do Brasil. Na década de 80, Almeida Filho (ALMEIDA FILHO, 1980) estimou uma taxa de prevalência de epilepsia ativa¹ de 0,1% na população em Salvador-BA; na mesma década, porém na outra extremidade do país (Porto Alegre) foi estimado uma prevalência de epilepsias de 0,2 a 2% (COSTA, DA et al., 1982); de forma complementar outro estudou mostrou uma prevalência de 1,65% de epilepsia ativa e 2,03% de epilepsia inativa² em Porto Alegre (FERNANDES et al., 1992); Marino e colaboradores estimaram prevalência de 1,19% na grande São Paulo (MARINO JR. et al., 1986). Já no século XXI, Borges e colaboradores investigaram a comunidade dos índios Bakairi residentes às margens do rio Paranatinga, afluente do rio Xingu, e estimaram prevalência de 1,2% para epilepsia ativa e de 0,6% para inativa (BORGES et al., 2002). Devido à sua grande prevalência e associação à diversos transtornos mentais como depressão, psicose e suicídio (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005), a epilepsia é definida como um problema de saúde pública, indicando a importância de pesquisas com o intuito de entender seus eventos biológicos.

A epilepsia geralmente é tratada com medicamentos, e em alguns casos com cirurgia, dispositivos ou mudanças alimentares. A composição da dieta interfere diretamente no metabolismo energético sendo uma forma viável para reduzir a frequência e/ou intensidade das crises. Por exemplo, a dieta cetogênica tem sido

¹ Epilepsia ativa, aquela onde o indivíduo tem ou teve pelo menos uma crise nos últimos cinco anos, independentemente de estar ou não em uso de drogas antiepiléticas.

² Epilepsia inativa, aquela que não ocorre crise durante os últimos cinco anos sem intervenção medicamentosa.

utilizada como terapia alternativa para pacientes com epilepsia com crises refratárias³ desde 1920 (PEREIRA et al., 2010). Esse efeito da dieta cetogênica indica que entender o metabolismo energético é fundamental para entender os processos biológicos relacionados à epilepsia.

Na busca por entender e caracterizar de forma detalhada as alterações anatômicas, farmacológicas, bioquímicas e fisiológicas que se estabelecem em decorrência da epilepsia, vários modelos animais têm sido utilizados, dentre eles o *Wistar Audiogenic Rats* (WAR), desenvolvido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) desde a década de 80. Este modelo surgiu a partir do endocruzamento⁴ de indivíduos que apresentavam sensibilidade auditiva; desde então esses ratos têm sido utilizados intensamente em pesquisas no Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento e Departamento de Fisiologia da FMRP, porém pouco se estudou sobre os aspectos energéticos nesse modelo. Sobre esses aspectos, destacam-se dois estudos: os de Botion e Doretto, que observaram que WAR após entrarem em *status epilepticus* (SE) apresentavam: (a) elevada glicemia; (b) aumento no lactato circulante - o que pode indicar insuficiência na fosforilação oxidativa (OXPHOS); (c) aumento da atividade adrenérgica, induzindo dessensibilização da via lipolítica b-adrenérgica no tecido adiposo epididimal (BOTION; DORETTO, 2003). Os estudos de Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2008) que observaram que WAR apresentavam: (a) via glicólica estimulada; (b) maior translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) no músculo gastrocnêmico e (c) redução nos níveis de glicogênio muscular.

A epilepsia promove lesões neuronais em inúmeras áreas cerebrais, especialmente a formação hipocampal (regiões de CA1, CA3 e hilo do giro denteado) e o córtex (FERNANDES, 2013). O hipocampo é uma estrutura do lobo temporal essencial para consolidação da memória (LODGE; GRACE, 2011). O córtex é uma fina camada de substância cinzenta que recobre o cérebro, responsável por receber

³ crises refratárias, também chamada de farmacorresistentes; chamadas assim por apresentarem falta de resposta ao tratamento com dois ou mais medicamentos antiepiléticos corretamente indicados e bem tolerados para conseguir o controle das crises de forma sustentada.

⁴ Endocruzamento é o acasalamento de indivíduos que são geneticamente próximos. Ex: Pais e filhos, meio irmãos e irmãos inteiros.

impulsos de todas as vias de sensibilidade, interpretar e responder todas essas informações; dessa região são transmitidos impulsos que iniciam e controlam os movimentos voluntários (O’MUIRCHEARTAIGH; RICHARDSON, 2012; BANDI et al., 2017), assim sendo uma das regiões importantes no disparo e/ou sustentação das crises epiléticas.

Tendo em vista a importância em compreender o metabolismo energético na epilepsia, o presente estudo tem como primeiro objetivo caracterizar o metabolismo energético da cepa WAR, com ênfase nos aspectos mitocondriais de OXPHOS, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo, biogênese e dinâmica mitocondriais no sistema nervoso central (SNC) e órgãos periféricos como fígado, músculo esquelético e coração, relacionando-os à aspectos fisiológicos do metabolismo corporal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

EPILEPSIA

O termo epilepsia deriva do verbo grego *epilambanein*, o qual significa ser atacada, dominada ou possuída. Por isso, por muito tempo essa patologia foi relacionada à fenômenos sobrenaturais, sendo considerada castigo ou possessão por espíritos divinos ou malignos, segundo papiros que datam de 3000 a.C. (O’DONOHOE, 1982). Atualmente, a epilepsia é considerada um conjunto de transtornos do SNC, caracterizado pelos episódios súbitos e transitórios de fenômenos anormais de origem motora, sensorial, autônoma e psíquica, ou seja, as crises epiléticas (FISHER et al., 2017).

A epilepsia é uma condição neurológica com prevalência de 1-3% da população mundial (FISHER et al., 2005, 2017; PEREIRA et al., 2010). Uma das formas de classificar a epilepsia é de acordo com o local cerebral de origem da crise epilética (YACUBIAN, 2002; FISHER et al., 2017): 1 – as decorrentes de uma região cerebral, classificadas como “crises parciais”, subdividida em dois subgrupos: simples (quando não há perda de consciência) e complexas (quando há perda de consciência, mesmo que instantâneas); 2 – as que possuem origem em várias regiões do cérebro em ambos os hemisférios, classificadas como “crises generalizadas”, também subdividida em dois subgrupos: convulsivas (quando durante a crise epilética há convulsão) e não

convulsivas (quando durante a crise epilética não há convulsão); 3 –aquelas que não se encaixam nas classificações anteriores denominadas “não classificadas”. Para classificação do paciente é feito um acompanhamento durante a crise epilética por meio do exame de eletroencefalograma.

Atualmente vários modelos experimentais de epilepsia têm sido propostos para a compreensão das epilepsias numa tentativa de representar com fidelidade o fenômeno natural humano. Os modelos podem ser induzidos farmacologicamente, por estresse físico, ou por seleção genética a partir de fenótipos. Consequentemente cada modelo apresenta um tipo de crise, como por exemplo a indução pelas drogas pentilenotetrazol (PTZ) e penicilina induzem crises generalizadas – convulsivas ou não – (AVOLI; GLOOR, 1982; MARESCAUX et al., 1984; TURSKI et al., 1987; VELISEK et al., 1992); eletrochoque intra-auricular induz crises generalizadas convulsivas (LÖSCHER et al., 1991); e na linha de seleção de fenótipos temos animais que apresentam sensibilidade auditiva com suscetibilidade à epilepsia, como as linhagens de animais Krushinsky-Molodkina (KMs), *Genetic Epilepsy Prone Rats* (GERP) e *Wistar Audiogenic Rats* (WAR) (KRUSHINSKY et al., 1970; DAILEY et al., 1989; GARCIA-CAIRASCO et al., 1990; ROSS; COLEMAN, 2000; FÉRES; CAIRASCO, 2001), os quais apresentam crises generalizadas.

EPILEPSIA AUDIOGÊNICA

A epilepsia audiogênica é um dos modelos experimentais que mimetiza a epilepsia em humanos. Nesse tipo de modelo os animais são induzidos por um estímulo sonoro, porém o desenvolvimento da crise também depende de uma característica geneticamente herdada (FÉRES; CAIRASCO, 2001). Os primeiros estudos utilizando esses modelos foram descritos em 1924 por um grupo soviético, a partir de ratos Wistar, chamada de linhagem KMs (KRUSHINSKY et al., 1970) a qual é amplamente utilizada em estudos comportamentais, eletrofisiológicos e neuroquímicos (KRUSHINSKY et al., 1970; ROSS; COLEMAN, 2000).

Outra linhagem de animais com sensibilidade auditiva é a GEPRs (DAILEY et al., 1989). No processo de seleção genética foram selecionados dois fenótipos: os GEPRs-3, que apresentavam crises moderadas e os GEPRs-9, que apresentavam crises severas. Em 1983, Penny e colaboradores (PENNY et al., 1983) caracterizaram essa

linhagem apontando um comprometimento na capacidade auditiva devido ao alongamento irregular de estereocílios e falhas nos feixes de células ciliadas do órgão de Corti, o qual é responsável pelas sensações auditivas e pela sensação de posição do corpo no espaço.

No Brasil também houve o desenvolvimento de outra linhagem de ratos com sensibilidade auditiva, iniciada na década de 80 no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE) do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, a qual foi denominada de WAR (GARCIA-CAIRASCO et al., 1990). Tal seleção se deu a partir de ratos Wistar que apresentavam crises frente a estímulos sonoros de alta intensidade (110-120 dB). Desde o início, os estudos neuroetológicos foram de grande valia para a caracterização comportamental das crises agudas e crônicas apresentadas por esses animais audiogênicos (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992, 2017; DORETTO et al., 2003), uma vez que, quando submetidos a um estímulo sonoro de alta intensidade desenvolvem crises generalizadas convulsivas do tipo tônico-clônica (BOTION; DORETTO, 2003).

LINHAGEM WAR

A seleção artificial por endocruzamento levou aos comportamentos de crises audiogênicas, contudo também trouxe à tona alterações fisiológicas que se refletem em comorbidades. Recentemente, estudos neuroendócrinos, cardiovasculares, farmacológicos e respiratórios revelaram as comorbidades associadas à epilepsia nestes animais, com a vantagem de não serem necessários estímulos químicos e/ou elétricos para indução das crises (GARCIA-CAIRASCO et al., 2017). Foi observado que os animais da linhagem WAR apresentam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) hiper-reativo, comprovado pelo maior peso da adrenal, pela maior liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em resposta ao estresse, e pelo maior glicocorticóide em resposta ao ACTH exógeno, quando comparado aos animais Wistar (UMEOKA et al., 2011). Estudos comportamentais demonstraram que WAR possuem alterações endógenas que se refletem em comportamentos como uma falha na capacidade de avaliação do nível de aversividade de novas situações (CASTRO et al., 2017). Também já foi verificado que WAR *naive* - não submetidos ao estímulo sonoro - apresentam um padrão de exploração reduzido no campo aberto e no labirinto em cruz

elevado, além de apresentarem um perfil ansiogênico quando comparados aos Wistar (GARCIA-CAIRASCO et al., 1998).

Os animais WAR tem sido utilizados em estudos para caracterização de sequências de comportamento das convulsões⁵ agudas audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO; TERRA, 1992; TSUTSUI et al., 1992; GARCIA-CAIRASCO et al., 1993), em estudos audiogênicos relacionados ao *kindling*⁶ (GARCIA-CAIRASCO; WAKAMATSU; et al., 1996; DUTRA MORAES et al., 2000; GALVIS-ALONSO et al., 2004), na avaliação de novos agentes anti-convulsivantes (DORETTO et al., 1998), e na pesquisa neuroquímica de convulsões audiogênicas (RIBEIRO DOS SANTOS, 2001); contudo pouco se sabe sobre o metabolismo e bioenergética desses animais, em relação ao metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) nenhum estudo foi realizado até o momento.

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E LÍPIDEOS EM WAR

Botion e Doretto (BOTION; DORETTO, 2003) estudaram as alterações no metabolismo de carboidratos após crises estimuladas por estímulos sonoros (3 estímulos com duração de um minuto, distribuídos por 72 horas) e observaram após as crises: aumento da glicemia e lactato circulantes tanto nos animais Wistar quanto WAR; reduzida concentração de glicogênio hepático em WAR, sugerindo que esses animais tem uma menor capacidade de armazenamento de glicogênio e/ou maior taxa de degradação, sendo que os estímulos sonoros estimulam as vias de produção de energia rápida, como a glicólise. Ainda no mesmo estudo, foi observado que WAR apresentam menores níveis de triglicerídeos plasmáticos, e menor capacidade lipogênica em relação aos animais Wistar; e estímulos sonoros levam ao aumento da capacidade lipolítica em ambos os grupos, contudo WAR apresentam uma menor capacidade lipolítica em relação aos animais Wistar.

Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2008) utilizando o mesmo protocolo verificaram a captação de glicose a nível periférico após estímulos sonoros, 10 dias após

⁵ início da crise, duração da crise, nível de consciência, orientação e capacidade motora.

⁶ *Kindling* ou abrasamento refere-se à indução de crises límbicas, mediante o uso de estímulos administrados repetidamente por um determinado período.

o último estímulo. Utilizando da metodologia de perfusão hepática observaram que não há alterações na captação de glicose pelo fígado de WAR quando comparados ao Wistar, estimulados ou não, mas há aumento da concentração de intermediários da via glicolítica, indicando que WAR possuem uma maior capacidade glicolítica, e corroborando aos achados descritos por Botion e Doretto (BOTION; DORETTO, 2003). Adicionalmente esses autores demonstraram que a estimulação sonora promove aumento nos níveis de transportador de glicose 4 (GLUT-4) em músculo gastrocnêmio.

SINALIZAÇÃO DO ATP / BALANÇO ENERGÉTICO NO SNC

Em 1929, Drury e Szent-Györgyi (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929) fizeram a primeira observação de que em altas concentrações do nucleosídeo adenosina e o nucleotídeo monofosfato de adenosina (AMP) poderiam: 1- reduzir a contratilidade cardíaca; 2- aumentar a vasodilatação coronariana; 3- inibir a contração intestinal; 4- promover sedação em roedores. Cinco anos depois, Gillespie (GILLESPIE, 1934) provou a relação entre a atividade e estrutura das purinas, observando que a deaminação reduzia a atividade e a defosforilação induzia resposta oposta: o nucleotídeo trifosfato de adenosina (ATP) induzia aumento da pressão sanguínea enquanto a forma não fosforilada induzia hipotensão, indicando pela primeira vez a existência de diferentes receptores purinérgicos, com efeitos até antagônicos. Décadas depois Burnstock (BURNSTOCK et al., 1970) demonstrou a existência de distintos receptores purinérgicos denominados P1 (adenosina) e P2 (ATP, ADP, UTP), concretizando a hipótese da transmissão purinérgica.

Atualmente sabemos que as purinas (ATP, AMP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras, dependentes de seus receptores para mediar seus efeitos biológicos (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2007; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012). Quando comparada à outras moléculas sinalizadoras, as purinas e pirimidinas possuem tamanho relativamente reduzido e são oriundas de moléculas abundantes dentro da célula, o que facilita sua biodisponibilidade, porém exige mecanismos de degradação e liberação muito eficientes (MOFFATT; ASHIHARA, 2002; BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK; RALEVIC, 2013; VIRGILIO, DI; ADINOLFI, 2017).

O ATP é distribuído em todo no sistema nervoso central e periférico, sendo fundamental à atividade celular. No neurônio é gerado através de três vias metabólicas: glicólise, ciclo de Krebs (CK) e fosforilação oxidativa (OXPHOS) na mitocôndria, sendo que a OXPHOS é responsável pela geração da maior parte. Desse modo, a produção de ATP via OXPHOS é diretamente proporcional ao consumo de oxigênio (O_2) e à demanda energética da célula (SPERLÁGH; VIZI, 1996; ENGEL et al., 2016). No neurônio, o ATP é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose dependente de ion cálcio (Ca^{+2}), juntamente com outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato, noradrenalina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (ZIMMERMANN, 1994; BURNSTOCK, 2006; PANKRATOV et al., 2006; ABBRACCHIO et al., 2009). Uma vez liberado no meio extracelular, o ATP interage com receptores e é rapidamente transformado em adenosina por uma cascata enzimática formada pelas ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2000; KUMARIA et al., 2008). Esse processo inclui a ecto-ATPase e ectonucleotidases (NTPDases, pirofosfatase nucleotídeo, fosfatase alcalina, ecto-5'- nucleotidase). A ecto-ATPase converte o ATP em ADP, as ectonucleotidases hidrolizam o ADP em AMP, e a ecto-5'- nucleotidase converte o AMP em adenosina. A adenosina produzida é transformada em inosina pela ação da adenosina deaminase (MEGHJI; NEWBY, 1990; RASSENDREN; AUDINAT, 2016), como ilustra a **figura 1**. Além de ser formada a partir da hidrólise do ATP, a adenosina extracelular pode ser produzida no meio intracelular e transportada para o meio extracelular através de transportadores específicos bidirecionais, os quais mantêm os níveis de adenosina em equilíbrio. A adenosina extracelular também pode ser formada a partir da degradação do monofosfato cíclico de adenosina (LATINI; PEDATA, 2001).

Figura 1: Esquema da hidrólise e síntese do ATP intracelular e extracelular pelas endo e ectonucleotidases, e a formação de seus metabólitos.

Enquanto ATP é co-liberado com outros neurotransmissores, adenosina exerce papel inibitório na liberação de neurotransmissores excitatórios no cérebro, alguns compostos naturais como a cafeína e teofilina que são caracterizados como antagonistas de adenosina comprovam esse papel inibitório, assim adenosina exerce papel de agente inibitório e anticonvulsivante endógeno (CHU, 1981; DUNWIDDIE et al., 1981; CHRISTOFI; COOK, 1985; AULT et al., 1987; SARRO, DE et al., 1997). Os efeitos inibitórios da adenosina foram descritos em diversos modelos experimentais de epilepsia, incluindo os modelos de: 1- crises audiogênicas (MAITRE et al., 1974); 2- *kindling* (CAVALHEIRO et al., 1987; BERMAN et al., 1990), 3- ácido cáínico (DUNWIDDIE; WORTH, 1982; CAVALHEIRO et al., 1987); 4- pilocarpina (GEORGE; KULKARNI, 1997; VIANNA et al., 2005). De forma complementar, já foi relatado um aumento na atividade das ecto-5'-nucleotidases como mecanismo compensatório para reduzir a excitabilidade neuronal e promover neuroproteção em modelos experimentais de epilepsia (BONAN et al., 2000; NICOLAIDIS et al., 2005; MASINO et al., 2012; CHIU; FREUND, 2014). Além da atividade anticonvulsivante, foi relatada capacidade neuroprotetiva da adenosina contra os efeitos excitotóxicos

desencadeados pela alta liberação de glutamato em processos isquêmicos (RUDOLPHI et al., 1992; WARDAS, 2002; KRITIS et al., 2015; TAMURA et al., 2016) e na epilepsia (MACGREGOR et al., 1996; CUNHA, 2005; VIANNA et al., 2005; GOMES et al., 2011).

METABOLISMO CEREBRAL

Apesar do cérebro representar apenas 2% do peso corporal, ele é o órgão responsável pela maior parte do consumo de O₂ (~ 20%) e glicose (~25%) corporais. Apesar do elevado consumo, o cérebro apresenta baixos níveis de armazenamento de glicose na forma de glicogênio (KRISTIÁN, 2004; BROWN; RANSOM, 2007), requerendo um fornecimento constante de glicose. Assim os níveis de glicose na corrente sanguínea são de extrema importância para a regulação do metabolismo cerebral (ALVAREZ-BUYLLA et al., 2003; MERGENTHALER et al., 2013; BUITRAGO BLANCO et al., 2016). Semelhante aos tecidos periféricos, a glicose é metabolizada principalmente pela glicólise e via da pentose fosfato (VPF) em neurônios e astrócitos. Dentre as células que compõem o cérebro, os astrócitos desempenham função importante no fluxo de substratos energéticos para os neurônios. Dentro dos astrócitos a glicose é oxidada parcialmente até a geração de piruvato, o qual é posteriormente convertido reversivelmente a lactato pela enzima lactato desidrogenase 5 (LDH-5) e secretado. Desse modo, os neurônios são capazes de captar o lactato e, através da enzima lactato desidrogenase 1 (LDH-1), converte-lo novamente em piruvato, o qual será utilizado como fonte energética (BITTAR et al., 1996; DEITMER, 2000; ROSS et al., 2010). A secreção e captação de lactato são realizadas por diferentes isoformas de transportadores de monocarboxilatos (MCT), sendo as isoformas 1 e 4 (MCT-1; MCT-4) encontrada nos astrócitos, e a isoforma 2 (MCT-2) encontrada nos neurônios (STEINMAN et al., 2016). Estudos de cinética enzimática revelaram que MCT-2 possui menor valor de KM (KM ~ 0,5mM) em comparação ao MCT-1 (KM ~ 3-5 mM) indicando o favorecimento da secreção de lactato por astrócitos e captação pelos neurônios (BOUZIER-SORE et al., 2002).

Nos neurônios, o piruvato entra na mitocôndria levando a formação de α -cetoglutarato no CK o qual pode ser convertido a glutamato por ação da glutamato desidrogenase (GDH) e exportado para o citosol para síntese de proteínas, glutatona, ou armazenado em vesículas como neurotransmissor (WHITELAW; ROBINSON, 2013).

Após a despolarização neuronal, o glutamato é liberado na fenda sináptica e captado principalmente pelos astrócitos por transportadores de glutamato (DANBOLT et al., 2016). Como o processo de liberação e captação do glutamato consome aproximadamente 75% da energia do SNC (NEHLIG; COLES, 2007), a reciclagem do glutamato pelo astrócito é uma forma de reduzir o custo energético (SCHOUSBOE et al., 2014). O glutamato é convertido à glutamina pelos astrócitos por ação da glutamato-amônia ligase (GAL), que em seguida é exportada para o espaço extracelular, captada pelos neurônios e reconvertida a glutamato, pela atividade da glutaminase (GLS). O glutamato é transportado para matriz mitocondrial, onde sofre ação da enzimas GDH e aspartato-aminotransferase (AST), produzindo o α -cetogluturato (MCKENNA, 2007; MCKENNA et al., 2016; PARPURA et al., 2017) que serve como substrato energético para o CK (MUSSULINI, 2017) (**figura 2**). Apesar da glicose estar diretamente vinculada a um harmonioso balanço entre anabolismo e catabolismo no SNC, com atividade excitatória e energética, os processos de oxidação que ocorrem dentro da mitocôndria são importantes fontes energéticas (MERGENTHALER et al., 2013).

Figura 2: Oxidação de substratos energéticos no sistema nervoso central.

BIOENERGÉTICA DE CRISES EPILÉTICAS PROLONGADAS

No metabolismo cerebral há uma frequente despolarização de 4 Hz que consome aproximadamente 30-50 μg ATP/g de tecido/minuto (HARDIE et al., 2012). Durante uma crise epilética ocorre uma despolarização 7,5 vezes maior, de ~ 30 Hz, e consequente aumento no consumo de ATP (TRUCCOLO et al., 2011; GORMAN et al., 2016). Estudos mostraram que há aumento no fluxo da via glicolítica no momento ictal – momento em que ocorre a crise – e redução em momentos interictais – momentos entre as crises - influenciando a modulação do metabolismo mitocondrial (STAFSTROM et al., 2008; LEE et al., 2012; ROWLEY et al., 2015; MUSSULINI, 2017)

Geralmente é observada deficiência no metabolismo mitocondrial em pacientes que apresentam crises epiléticas (LIANG et al., 2012), comumente devido a deficiências na CTE (TENNEY et al., 2014). Apesar da via glicolítica ser a principal provedora de ATP durante as crises epiléticas, os neurônios possuem capacidade glicolítica restrita (ZSURKA; KUNZ, 2015) e ao decorrer da crise há redução nos níveis de glicose encefálicos (THEODORE et al., 2004) o que exige ATP mitocondrial durante as crises epiléticas prolongadas (AAS et al., 1993; MCNALLY; HARTMAN, 2012; MCKENNA, 2012). Corroborando a isso, pacientes afetados pela síndrome de disfunção dos transportadores de glicose apresentam crises epiléticas (LARSEN et al., 2015). Como exemplo temos a síndrome De Vivo, descrita em recém-nascidos que apresentam quadro convulsivo, normoglicemia, redução no conteúdo de GLUT1 nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e mitocôndrias saudáveis (WANG et al., 1993; MACHADO, 1998; PASCUAL et al., 2004).

Por meio da avaliação por emissão de pósitron por ^{18}F -fluorodesoxiglicose, foram relatados hipermetabolismo glicolítico no foco epilético em pacientes com epilepsia refratária (HODOLIC et al., 2016; ZIMMER et al., 2017). Em momentos de despolarização há aumento de 5 vezes nas concentrações de glutamato na fenda sináptica, o que retorna a concentração normal após 10 milissegundos (DZUBAY; JAHR, 1999; KATAGIRI et al., 2001). Para captação do glutamato é consumindo grande quantidade de ATP (DZUBAY; JAHR, 1999; KATAGIRI et al., 2001; DANBOLT, 2001; DANBOLT et al., 2016). Recentemente foi demonstrado que a captação e oxidação de glutamato são capazes de modular a captação de glicose e consequentemente sua oxidação (ZIMMER et al., 2017; SCHOUSBOE, 2017), e que a

completa oxidação do glutamato ocorre mesmo em momentos de alto fluxo da via glicolítica (PARPURA et al., 2017). Além do glutamato, outros substratos energéticos estão presentes no SNC, como a glutamina (SIMPSON; SHERRARD, 1969), lactato (ORRINGER et al., 1977) e corpos cetônicos (SEYMOUR et al., 1999), substratos que são oxidados na matriz mitocondrial.

MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é o resultado provável da simbiose entre uma α -protobactéria e um eucarioto há 1,5 bilhões de anos (XIONG et al., 2014). A partir dessa simbiose os eucarióticos obtiveram capacidade energética para sintetizar moléculas mais complexas como ácidos nucleicos e lipídeos, aumentando a probabilidade do surgimento de seres multicelulares (LANE; MARTIN, 2010). Na mitocôndria se encontra uma maquinaria altamente eficiente para síntese ATP por um processo chamado de fosforilação oxidativa (OXPHOS). A mitocôndria possui seu próprio DNA (DNAm_t), mas boa parte do seu DNA foi compartilhado com o núcleo eucariótico que possui melhores condições de armazenamento (GRAY, 2012). O DNAm_t é capaz de codificar 22 RNAs de transferência, 2 RNAs ribossomais e 13 proteínas componentes da CTE (ANDERSON et al., 1981). A mitocôndria é fundamental para processos anabólicos (RYGIEL et al., 2016), detoxificantes (YOSHIMI et al., 2016), sinalizatórios (MILLS; O'NEILL, 2016), tamponantes (ARCO, DEL et al., 2016), apoptóticos (ZHAO et al., 2016) e catabólicos (IOMMARINI et al., 2017), processos geralmente associados à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes da CTE (YU et al., 2017). Mitocôndrias são constituídas por duas membranas, uma externa lisa e outra interna pregueada; esta última forma cristas que delimitam a matriz mitocondrial. Na matriz mitocondrial localiza-se o complexo da piruvato desidrogenase, e diversas enzimas que compõem o CK, a β -oxidação de ácidos graxos, a oxidação dos aminoácidos, além do DNAm_t e metabólitos.

Podemos dizer que o processo de geração de ATP pela mitocôndria começa a partir da utilização da acetil-CoA, que se origina da oxidação de carboidratos, ácidos graxos e alguns aminoácidos. Os grupos acetil são introduzidos no CK onde será oxidado por uma sequência de reações gerando CO₂, NADH, FADH₂ e GTP (ou ATP). Assim a energia liberada pela oxidação é armazenada na forma de equivalentes redutores/coenzimas - NADH e FADH₂. Para utilização dessa energia, as coenzimas

doam os elétrons para a CTE: NADH doa elétrons para o complexo NADH-Q oxidorreductase (também chamada de complexo I – CI), enquanto o FADH₂ doa seus elétrons para a enzima succinato desidrogenase [é a única enzima do ciclo de Krebs ligada à membrana mitocondrial interna - também chama de complexo II (CII)], depois os elétrons são levados ao Q-citocromo *c* oxidorreductase (CIII) via ubiquinol. Citocromo *c* oxidase transfere elétrons do complexo III para o complexo Citocromo *c* (CIV), o qual reduz o ½ O₂ à H₂O (NELSON; COX, 2008). Durante essa passagem dos elétrons pela CTE há o bombeamento de prótons pelos CI, CIII e CIV da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas, gerando um gradiente eletroquímico entre o espaço intermembranas e a matriz. Este gradiente de H⁺ e o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) somados resultam em uma força chamada força próton-motiva (FPM). Segundo Mitchell (MITCHELL, 1961), a FPM seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP. O $\Delta\Psi$ atinge valores de aproximadamente 180 mV no estado de repouso, enquanto o gradiente de H⁺ oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de prótons para a matriz mitocondrial, desta vez a favor do gradiente, através da FoF1-ATP sintase é acoplado à fosforilação do ADP. Apesar deste processo ser altamente eficiente, parte dos prótons podem retornar a matriz mitocondrial sem fosforilar o ADP, esse processo denominado desacoplamento mitocondrial, o qual pode ser realizado através de proteínas desacopladoras (UCP)(NICHOLLS, 1976), desacopladores químicos, como o 2,4-dinitrofenol (DNP) (PERKINS, 1919) e a carbonilcianeto-m-clorofenilidrazina (CCCP) (RASTOGI et al., 1988).

BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

Para a biogênese mitocondrial é necessário a expressão de dois genomas: o mitocondrial que codifica 13 proteínas, e o nuclear que codifica todas as outras proteínas necessárias, assim se tornando um processo altamente regulado. A sincronia entre núcleo e mitocôndria é essencial para que a eficácia do processo. Existem diversos fatores que regulam esse processo, desde disponibilidade de energia e demandas de crescimento, incluindo estresse metabólico celular, tal como a constante produção de EROs. Inicialmente núcleo é responsável por codificar fatores de transcrição e co-ativadores que governam a função mitocondrial, incluindo as proteínas envolvidas em replicação e transcrição do DNAm (SCARPULLA et al., 2012). Os primeiros fatores

transcricionais nucleares envolvidos no controle de múltiplas funções mitocondriais em vertebrados descritos foram os fatores respiratório nuclear 1 e 2 (NRF1 e NRF2). Foi identificado a ligação de NRF1 com o promotor citocromo c, funcionando como regulador positivo na transcrição de genes codificadores de subunidades respiratórias (KELLY; SCARPULLA, 2004; SCARPULLA, 2011), enquanto NRF2 foi identificado como um ativador transcricional da citocromo oxidase subunidade IV. Ambos os fatores foram descritos como responsáveis diretos da expressão de todas as 10 subunidades codificadas do núcleo de citocromo c oxidase (ONGWIJITWAT et al., 2006; DHAR et al., 2008), comprovando o mecanismo coordenando da expressão da CTE com a biogênese da organela (DONOHOE et al., 1999; HUO; SCARPULLA, 2001).

Dentre os diversos fatores que são capazes de induzir a biogênese mitocondrial, vale ressaltar o papel do co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1 α). Através da superexpressão de PGC1 α em cultura de células (PUIGSERVER et al., 1998; LEHMAN et al., 2000) e em camundongos (RUSSELL, 2004) foi demonstrado que PGC1 α é capaz de induzir todos os aspectos da biogênese mitocondrial, incluindo o aumento da expressão de proteínas da CTE e β -oxidação de ácidos graxos, além de aumentar o número de mitocôndrias e da capacidade respiratória através de interação direta e co-ativação de outros fatores transcricionais (como NRF1/NRF2). PGC1 α é diretamente regulada por deacetilação (por sirtuinas - SIRT1) e fosforilação (por proteína quinase ativada por AMP - AMPK) em resposta a mudanças em nutrientes ou depleção energética (GERHART-HINES et al., 2007; JAGER et al., 2007). As vias de SIRT1 e AMPK também podem cooperar na promoção de biogênese mitocondrial cálcio-dependente em miócitos (CANTÓ; AUWERX, 2009; IWABU et al., 2010). Em animais com deficiência de SIRT1 não são observados os efeitos da restrição calórica - uma forma de regular positivamente o PGC1 α -, enquanto sua superexpressão promove os efeitos benéficos da restrição calórica mesmo quando o camundongo é alimentado normalmente (DONMEZ; GUARENTE, 2010), indicando que PGC1 α é regulado em respostas as condições energéticas da célula, dependente de AMPK e SIRT1.

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma proteína quinase que fosforila o sítio serina/treonina de seus alvos e tem sua ação inibida pela rapamicina. mTOR é formada por dois complexos proteicos denominados complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2) (SAXTON; SABATINI,

2017): o mTORC1 modula a tradução em resposta a nutrientes, hormônios e fatores de crescimento e também é composto por três proteínas: 1-proteína regulatória associada a TOR (Raptor); 2- proteína GTPase subunidade β (mLST8); 3-proteína de interação que contém o domínio mTOR (Deptor), sendo que a última tem papel inibitório na mTORC1 (HOEFFER; KLANN, 2010). mTORC2 fosforila membros da família de proteínas quinase tais como proteína quinase B (AKT), proteína quinase regulada por glucocorticóides 1 (SGK1) e proteína quinase C (PKC), ou seja, sua atividade ocorre em resposta a sobrevivência celular e a organização do citoesqueleto (GARCÍA-MARTÍNEZ; ALESSI, 2008; LAPLANTE; SABATINI, 2012). Dentre as mais de 500 proteínas que AMPK pode interagir está a mTOR (HOFFMAN et al., 2015), e dentre suas respostas está a indução de biogênese mitocondrial (INOKI et al., 2003; GWINN et al., 2008). A AMPK também pode estimular a destruição de mitocôndrias defeituosas através de mitofagia (EGAN et al., 2011; KIM et al., 2011). Assim temos três alvos que desencadeiam a biogênese mitocondrial: PCG1 α , mTOR e AMPK.

mTOR E EPILEPSIA

A via de sinalização mTOR funciona como um mecanismo regulador central do crescimento, metabolismo e sobrevivência celular, controlando a transcrição e tradução de proteínas importantes para estes processos celulares (WONG, 2010). Essa via é modulada por diversos sinais como a insulina e nutrientes (aminoácidos) (LAPLANTE; SABATINI, 2012). mTOR está envolvida na plasticidade sináptica, o que pode influenciar a excitabilidade neuronal e ser responsável pela epileptogênese (MENG et al., 2013). Há relatos intrigantes da hiperativação frequente da sinalização mTOR na epilepsia, assim se tornando um possível mecanismo na patogênese e, consequentemente um atraente alvo terapêutico (CITRARO et al., 2016).

Estudos tem demonstrado que a inibição de mTOR por tratamento com rapamicina reduz o número de crises espontâneas recorrentes, bem como a duração das crises induzidas por pilocarpina (HUANG et al., 2010). A prévia administração de rapamicina reduz várias alterações patológicas induzidas por ácido cáínico, como o desenvolvimento de crises epiléticas espontâneas; sua administração posterior reduz a frequência das crises espontâneas, mas não a morte de neurônios hipocâmpais (ZENG et al., 2009). Já em camundongos com deleção seletiva do gene para *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) [uma fosfatase que regula a atividade de fosfatidilinositol 3-

quinase (PI3K), consequentemente aumentando a ativação de AKT e mTOR], a inibição de mTOR por tratamento crônico com CCI-779 ou rapamicina reduz a frequência de crises convulsivas e a mortalidade (KWON et al., 2001; ZHOU et al., 2009).

Corroborando a esses achados temos estudos mostrando que a indução das crises epiléticas por ácido caínico induz a ativação de mTOR inicialmente no hipocampo e neocórtex 1 h após a injeção da droga, e termina 24 h após o *status epilepticus* (SE); posteriormente ocorre ativação apenas no hipocampo (crise recorrente) e se inicia 72 h depois do SE (ZENG et al., 2009); em outro estudo utilizando camundongos com uma mutação que promove um aumento de ativação de AKT, foi demonstrado maior susceptibilidade a crises induzidas por PTZ, além de apresentarem crises espontâneas esporádicas, já em animais deficientes em AKT, foi apresentado resistência para crises convulsivas (TOKUDA et al., 2011). Posteriormente foi demonstrado que a indução de crises por PTZ promove imediata ativação de mTOR, porém de forma transitória, o que não foi observado cronicamente, sugerindo um envolvimento limitado de mTOR sobre as crises e epileptogênese (ZHANG; WONG, 2012).

ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma situação onde se encontra em desequilíbrio a geração de radicais livres e defesas antioxidantes (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Em situações normais há um equilíbrio entre a geração de EROs e sistemas antioxidantes. Porém, quando produzidas em desbalanço, as EROs podem reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA levando assim a modificações de DNA, proteínas e lipídios, o que pode ser mensurado pela quantificação de malondialdeído (produto da oxidação de ácidos graxos), proteínas carboniladas, 5-HMdU (produto da oxidação do ácido nucleico timina) (BIRBEN et al., 2012). Além disso, a produção de EROs e o acúmulo de seus danos são um denominador comum em muitas doenças tais como a epilepsia, e pode conduzir a um dano celular grave levando a uma disfunção fisiológica e até a morte celular (SCANDALIOS, 2005).

Todos os órgãos/tecidos estão suscetíveis ao estresse oxidativo, porém o cérebro é o mais vulnerável uma vez que contém grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, além de possuir menor capacidade antioxidante quando comparado aos outros tecidos (DAL-PIZZOL et al., 2000). Após convulsão é notado morte neuronal, o que pode estar relacionado ao estresse oxidativo que pode alterar dramaticamente a

função celular e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos (DAL-PIZZOL et al., 2000; FRANTSEVA, M. V et al., 2000; FRANTSEVA, M. V. et al., 2000a).

Foi sugerido que o dano neuronal após o estado epilético induzido por pilocarpina seria resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH\cdot$) e superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (JAMIESON et al., 1986). Danos nas membranas celulares e/ou mitocondriais como a peroxidação lipídica podem contribuir de forma significativa para alterações funcionais nessas membranas durante a epileptogênese. Dados na literatura demonstram que o aumento na produção de radicais livres e dano lipídico por lipoperoxidação ocorrem durante as convulsões e na injúria neuronal mediada pelo processo convulsivo (DAL-PIZZOL et al., 2000; FRANTSEVA, M. V et al., 2000; FRANTSEVA, M. V. et al., 2000a).

Tem sido relatado em diversos modelos experimentais, principalmente roedores, a relação entre quadro de estresse oxidativo e crise epilética, assim como morte de células neuronais e gliais. Em modelo induzido por ácido caínico foi relatado aumento de oxidação protéica e lipídica no hipocampo de animais entre 4 e 24 horas após a administração da droga (KIM et al., 1997); já em modelo induzido por pilocarpina, foi observado níveis aumentados de peroxidação lipídica durante o período agudo das convulsões em várias áreas cerebrais de ratos (FREITAS et al., 2004); níveis elevados de lipoperoxidação também foram relatados em hipocampo de ratos nas fases aguda e crônica de convulsões induzidas por pilocarpina ou ácido caínico, e na epilepsia induzida por *kindling* (DAL-PIZZOL et al., 2000; FRANTSEVA, M. V. et al., 2000). Segundo Devi e colaboradores (DEVI et al., 2008), o balanço pró-oxidante/antioxidante não é apenas modulado pelas convulsões, mas também pelas drogas antiepiléticas. Assim é possível a contribuição dos antioxidantes como adjuvantes às drogas antiepiléticas para um melhor controle das convulsões como um interessante alvo terapêutico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desse estudo foi caracterizar o metabolismo mitocondrial em animais com sensibilidade auditiva e suscetibilidade a epilepsia da cepa *Wistar audiogenic rats* (WAR), e determinar se a mitocôndria tem papel relevante na crise audiogênica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ▶ Caracterizar o metabolismo mitocondrial nos tecidos hepático e musculares (sóleo e cardíaco) e relacioná-los ao metabolismo corporal em WAR não submetidos a estímulos sonoros;
- ▶ Caracterizar o metabolismo mitocondrial no tecido cerebral – nas regiões hipocampo e córtex – em WAR não submetidos a estímulos sonoros e após submissão ao *kindling* audiogênico;
- ▶ Investigar a importância do metabolismo mitocondrial e das EROs na crise epilética de WAR por meio do tratamento in vivo com DNP (desacoplador mitocondrial) ou NAC (indutor do sistema antioxidante).

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar e ratos machos da cepa *Wistar audiogenic rats* (WAR), ambos com aproximadamente 80 dias de vida; animais Wistar foram fornecidos pelo biotério geral do *campus* USP-RP, animais WAR foram fornecidos pelo biotério geral cepas especiais do *campus* USP-RP. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP, recebendo dieta balanceada (NUVLAB CR1 – NUVITAL; 22% proteína, 55% carboidratos e 4,5% lipídios) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 25 ± 2 ° C. Todos os animais permaneceram nestas condições ambientais por pelo menos 48 horas antes de qualquer procedimento. Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FMRP/USP (protocolo nº 011/2015).

Para a segunda parte do projeto, onde se estudou o metabolismo mitocondrial nas regiões cerebrais - hipocampo e córtex – foram utilizados animais Wistar e WAR com 70 dias de vidas, no 71º dia de vida os animais iniciaram o procedimento *kindling* audiogênico, após 20 estímulos (10 dias), os animais foram eutanasiados, e as análises bioquímicas realizadas em seguida.

Para a terceira parte do projeto, onde se estudou a influência das EROs sob a crise epilética, foram utilizados animais da cepa WAR com aproximadamente 40 dias de vidas. Os animais foram divididos em três grupos: 1- WAR, alimentado com ração padrão (NUVLAB CR1) e água *ad libitum*; 2- WAR-DNP, alimentado com ração comercial *ad libitum* e tratados com dinitrofenol (1 mg/L) adicionado à água oferecida; 3 WAR-NAC, alimentado com ração comercial *ad libitum* e tratados com N-acetilcisteína (2 g/L) adicionado à água oferecida. Os grupos permaneceram sob essas condições durante 40 dias.

INVESTIGAÇÃO DA INGESTÃO HIDRICA E ALIMENTAR

Neste protocolo os animais foram mantidos individualmente em gaiola metabólica, onde foi monitorada a ingestão hídrica, alimentar além de mensurar a massa fecal e volume urinário diariamente, esse procedimento foi efetuado durante sete dias.

INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO CORPORAL POR MEIO DE CALORIMETRIA INDIRETA

Após ambientação de 48 horas foi iniciada a mensuração do metabolismo corporal dos animais por calorimetria indireta utilizando-se calorímetro Sistema Oxylet, Panlab®, Espanha. O protocolo foi conduzido utilizando-se caixas de acrílico, cada uma contendo dois animais de cada grupo. Cada par de animais permaneceu na caixa durante um período de 48 horas, enquanto tinham seu metabolismo mensurado por meio das seguintes variáveis: volume de oxigênio consumido (VO_2); volume de gás carbônico produzido (VCO_2); coeficiente respiratório (RQ) – $RQ = VCO_2 / VO_2$ - e gasto energético total (EE), sendo que o EE foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $EE = (3,85 + (1,232 \times RQ)) \times VO_2 \times 1,44$. Adicionalmente, foi mensurado o grau de movimentação dos animais. O experimento teve uma duração total de 6 dias.

SACRIFICIO E REMOÇÃO DE TECIDOS E FLUIDOS

Ao final do período experimental os animais foram anestesiados em câmara de CO_2 e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado para posterior análise. Os tecidos adiposos brancos (retroperitoneal, perirenal epididimal), músculos (*soleus*, gastrocnêmico e cardíaco), fígado e cérebro foram rapidamente retirados e pesados. Uma alíquota dos tecidos foi separada para mensuração do consumo de oxigênio, o restante foi armazenado em freezer ($-80^\circ C$), e uma porção maior do fígado que foi utilizada no isolamento de mitocôndria.

TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Aos 70 dias de vida os animais foram colocados em jejum por um período de 12 horas para o teste de tolerância à insulina e para tal procedimento foi utilizado um glicosímetro (Onetouch® Ultra®, Johnson & Johnson Company, EUA). Inicialmente, por meio de um corte feito na extremidade da cauda do animal, uma gota de sangue foi utilizada para se determinar a glicemia em jejum (tempo zero) e logo em seguida, os animais receberam 2,5U/kg de insulina por meio de injeção intraperitoneal. A glicemia foi verificada novamente, após 20 minutos. A velocidade constante de decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose durante a fase de decaimento linear (BONORA et al., 1989). A interpretação do Kitt se baseia no fato de

que quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível é o indivíduo à insulina. Assim, quanto maior o Kitt, maior a sensibilidade à insulina.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FÍSICO – TESTE INCREMENTAL DE CARGA

Previamente à aplicação do teste de esforço, os animais realizaram processo de familiarização com a esteira durante cinco dias, em velocidade de 5-10m/min durante 10 minutos, a fim de diminuir o estresse. Após 24 horas de recuperação, os animais (em jejum de 15 horas ou não) foram submetidos ao teste incremental de carga. Conforme padronizado por Ferreira (FERREIRA et al., 2007), o teste de carga incremental foi iniciado na velocidade de 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária dos animais, que ocorreu quando os mesmos encostarem 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1 min.

AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA

O comprimento naso-anal (CNA) foi mensurado no último dia do período experimental para cálculo do índice de Lee - índice de massa corpórea (LEE, 1929) obtido pela razão da raiz cúbica do peso corporal (em gramas) e o CNA (em centímetros) multiplicados por 1000.

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}}}{\text{CNA (cm)}} \times 1000$$

Este parâmetro é usado como um índice de obesidade em roedores que possibilita uma avaliação subjetiva do estado nutricional do animal (BUNYAN et al., 1976).

KINDLING AUDIOGÊNICO

Animais com 70 dias de vidas, foram submetidos ao *kindling* audiogênico, que consiste na estimulação acústica por um som de alta intensidade. Além do tempo de duração do estímulo, os animais foram observados durante um minuto antes e um minuto após o mesmo. O procedimento consiste em colocar os animais em uma gaiola cilíndrica acústica (32 x 36 cm) transparente, dentro de uma caixa de madeira maior, à prova de som, com portas de vidro frontais. Os animais foram expostos a um som de

alta intensidade (120 dB e 60 Hz - durante 60 segundos ou até atingirem maior grau no índice de gravidade das crises mesencefálica), fornecidos por uma gravação no computador e entregue à câmara acústica através de um alto-falante presente na parte superior da gaiola cilíndrica. Os estímulos foram realizados duas vezes ao dia (8-10 h e 16-18 h) por 10 dias, totalizando 20 estímulos. O índice de severidade categorizado (ISc) das crises mesencefálicas foi determinado com base no índice categorizado por Rossetti (ROSSETTI et al., 2006), como mostrado na **tabela 01**.

Tabela 1: Índice de gravidade de crises mesencefálicas segundo Rossetti et al. (2006).

Índice	Comportamento
0	Sem crise
1	Uma corrida e giros
2	Giro, corrida, pulo e queda atônica
3	Duas corridas, giros e queda atônica
4	Comportamentos anteriores e convulsão tônica
5	Comportamentos anteriores e clonias parciais e generalizadas
6	Comportamentos anteriores e flexão de cabeça
7	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas anteriores
8	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas posteriores

ANÁLISES PLASMÁTICAS

Parte do sangue foi coletada em tubo contendo anticoagulante para obtenção do plasma, o restante coletado em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro. Para determinação do perfil lipídico circulante (HDL, colesterol total e triglicérides), glicemia, uréia e dano hepático (aminotransferase de aspartate – AST e aminotransferase de alanine – ALT) foram utilizados métodos enzimáticos colorimétricos (Labtest®, Brasil) seguindo as instruções do manual do fabricante.

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FECAL

Aminoácidos - 0,5g das fezes foram dissolvida em 2,5mL de NaOH (30%), em seguida coloca em banho Maria (100°C) por 90 minutos para hidrolisar as proteínas, após o período de hidrolise, 0,5mL da mistura foi retirada e adicionada em um tubo de ensaio que continha 4mL de água deionizada, 1mL de ninidrina (8% em acetona), em seguida o tubo foi coberto com papel alumino, e colocado em banho Maria (100°C) por 15 minutos, após o termino de incubação foi adicionado 1mL de etanol ao tubo, a

mistura foi mensurada em espectrofotômetro a 570nm, glicina foi utilizado como padrão (MEYER, 1957).

Lípídeos – 0,5g das fezes foram dissolvido em 2mL de água deionizada, em seguida adicionada 2mL de metanol e agitado por aproximadamente 2 minutos, posteriormente adicionado 2,5mL de clorofórmio e 2,9mL de metanol, seguido de uma agitação por aproximadamente 1 hora (temperatura ambiente), após período de agitação foram adicionado 2,5mL de clorofórmio e 2,5mL de água deionizada ao tubo, e centrifugado a 1000rpm por 2 minutos, dessa forma os lípídeos ficaram na camada superior. A camada superior foi transferida a um novo tubo, em seguida colocado em capela com exaustor para secagem, então foram pesados (BLIGH; DYER, 1959).

Carboidratos – 0,5g das fezes foram dissolvidos em 2,5mL de NaOH (30%), e aquecido à 100°C durante 90 minutos, após período de hidrolise foram adicionado 10mL de etanol e agitado, então o material foi centrifugado (4000g, 10 minutos a 4°C), em seguida o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspendido em 2mL de água deionizada e 4mL de etanol gelado, e novamente centrifugado (4000g, 10 minutos e 4°C), então o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5mL de água deionizada. 200µL da amostra foram transferido para o tubo contendo 200µL de fenol (5%) e 1mL de ácido sulfúrico, a concentração de carboidratos foi mensurada em espectrofotômetro a 490nm, solução de glicose foi utilizado como padrão (DUBOIS et al., 1956).

ISOLAMENTO DE MITOCONDRIA DE FIGADOS

Após sacrifício dos animais e remoção do fígado, o tecido hepático foi picotado em meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2) e EGTA 1 mM a 4°C acrescido de BSA 0,1 % e homogeneizado em 3 ciclos em homogeneizador rotativo (140 rpm) no gelo. O homogenato resultante foi centrifugado a 4°C (rotor Hitachi RT15A5) como descrito anteriormente por Alberici (ALBERICI et al., 2006), após 10 minutos de centrifugação a 700 g, o pellet foi descartado e o sobrenadante foi, então, novamente centrifugado durante 10 minutos 10000 g. A camada lipídica flutuante foi retirada com pipeta de Pasteur e em seguida o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspendido delicadamente em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2) e EGTA 0,1 mM a 4°C utilizando-se um pincel e

novamente foi centrifugado durante 10 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet, contendo a fração mitocondrial, foi ressuspendido em 200 µL de meio contendo sacarose 250 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2). As mitocôndrias foram utilizadas em procedimentos experimentais dentro de um período máximo de 3 horas após o seu isolamento. A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto.

MEIOS DE ENSAIO

Os ensaios utilizando mitocôndrias isoladas utilizaram meio de respiração padrão (sacarose 125 mM, HEPES 10 mM, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EGTA 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,2) a 30°C, na presença de 5 mM de substratos energéticos glutamato e malato (2,5 mM cada), ou succinato (5 mM). Os ensaios utilizando biópsias utilizaram meio MIR05, (EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, K-lactobionato 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, albumina bovina sérica livre de ácidos gráxos 1 g/L, pH 7,1) a 30°C na presença de 5 mM de substratos energéticos glutamato e malato (2,5 mM cada), ou succinato (5 mM).

CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de oxigênio foi monitorado utilizando-se um eletrodo do tipo oxygraph-2k (Oroboros Instruments – *high resolution respirometry*) em câmara de 2 mL de volume, com temperatura controlada (30°C para mitocôndrias isolada e 37°C para biópsias) e equipada com agitador magnético (300rpm). A respiração após adição da mitocôndria isolada ou biópsia foi denominada de Routine, após adição de substrato (glutamato – 10mM, malato – 2mM ou succinato 10mM) foi denominada de NADH-linked, a capacidade de fosforilação ou estado OXPHOS foi iniciada após adição de ADP (0,2mM), afim de mensurar o estado LEAK foi adicionado oligomicina A (1,2µM), a capacidade máxima de transporte de elétrons foi mensurada na presença de Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP - 1µM), o consumo de oxigênio que não é mitocondrial foi mensurado após adição de antimicina A (1µM).

ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

A produção de EROs (H₂O₂) foi monitorada espectrofluorimetricamente (Hitachi F-4500) pela conversão de *Amplex Red*, (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, 10

μM, Molecular Probes), na presença de *Horseradish peroxidase* (HRP) 0,025 μM, em resorufina, um composto altamente fluorescente (ZHOU et al., 1997) que absorve e emite de fluorescência em 563 nm e 587 nm respectivamente. Em uma cubeta com 2mL de meio (respiração padrão para mitocôndrias isoladas, MIR05 para biopsia), foi adicionada a amostra na presença de HRP, *Amplex Red*, e substratos (glutamato – 10mM, malato – 2mM ou succinato 10mM) e monitorada durante 10 minutos.

DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX

O estresse oxidativo é definido como um balanço que favorece a produção de EROs sobre as defesas antioxidantes. Nesse contexto, o estado redox foi determinado pelas concentrações de glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e proteínas carboniladas; as glutathionas representam, junto com suas enzimas relacionadas, uma das formas mais importantes de proteção contra o estresse oxidativo e detecção de proteínas carboniladas, um marcador de dano oxidativo em proteínas (OTT et al., 2007).

O preparo da amostra para determinar a concentração de glutathionas– 30mg do tecido foi homogeneizado em 1mL tampão Tris (0,1M, pH 7,2) e logo em seguida foram adicionados 200 μL de TCA (30 %) seguido de mais uma homogeneização da mistura. O homogenato foi centrifugado a 2000g por 6 min. O sobrenadante resultante foi utilizado para determinar as concentrações de GSH e GSSG (HISSIN; HILF, 1976).

GSH - Junto aos 100 μL de sobrenadante foram adicionado 2,04 mL de tampão fosfato 100 mM acrescido de EGTA 6 mM e 100 μL de o-ftaldeído (OPT) (1 mg/mL). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e logo em seguida foi realizada a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro *Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader* - Biotek nas condições de 350 nm de excitação e 420 nm de emissão.

GSSH - Junto aos 100 μL de sobrenadante foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 100 mM acrescido de EGTA 6 mM mais 40 μL de N-etilmaleimido (NEM) 2mM. As amostras foram incubadas à temperatura durante 30 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH 1M e 100 μL de OPT (1 mg/mL). Novamente as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e então foi feita a leitura da fluorescência utilizando-se espectrofluorímetro *Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader* - Biotek nas condições de 350 nm de excitação e 420 nm de emissão.

Proteínas carboniladas - A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada utilizando-se método colorimétrico através da reação de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) com grupo carbonil das proteínas para formar hidrazona, um composto que pode ser

detectado espectrofotometricamente a 370 nm (REZNICK; PACKER, 1994). Assim, aproximadamente 50 mg de tecido foram homogeneizado em 1 mL de tampão Tris (0,1 M, pH 7,2) e depois centrifugado (1500 g, a 4° C durante 10 minutos). Do sobrenadante resultante foram retirados 300 µL para quantificação de proteína carbonilada, em triplicata. Ao sobrenadante fora acrescentado 700 µL de água e 2 mL de TCA 10%. A mistura foi agitada e centrifugada a 500 g a 4° C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet foi adicionado 1 mL de DNPH (10 mM) em 2 dos tubos e 1 mL de HCl 2,5M em 1 dos tubos para determinação do branco. Os tubos foram incubados a 37° C na ausência de luz. Em seguida, acrescentado 4mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% aos tubos, e novamente centrifugados a 500g a 4°C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet resultante foi lavado 2 vezes com 2 mL de etanol:acetato de etila na proporção 1:1, então o pellet resultante foi ressuscitado em 2 mL de guanidina (6 M) e incubado à temperatura ambiente durante 40 minutos, com agitação. A leitura colorimétrica das amostras e de seus respectivos brancos foi realizada em comprimento de onda de 370 nm.

A determinação da concentração de proteína carbonilada nas amostras foi calculada pelo coeficiente de extinção molar (18,11 M⁻¹.cm⁻¹); a quantificação de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

QUANTIFICAÇÃO DE RNAm

Extração de RNA - RNA total foi extraído de amostras congeladas utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os pellets de RNA resultantes da extração foram ressuscitados em água livre de nucleotídeos e sua quantificação foi realizada utilizando-se NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®).

Síntese de cDNA - 1,5 µg do RNA extraído foram utilizadas para a síntese de cDNA, utilizando-se um mix contendo Oligo dT primers (500 µg/mL), Buffer RT, MgCl₂ (25 mM), dNTP, RNase (40 u/µL) out RT íntron (160 u/µL) (Promega- Madison, WI, USA). As amostras contendo RNA e o mix foram incubadas durante 5 minutos a 25 °C, depois por 60 minutos a 42 °C e finalmente por 15 minutos a 70 °C. O cDNA resultante foi diluído (1 µL cDNA: 3 µL H₂O) para sua quantificação em real time PCR.

Real time qPCR - A quantificação de mRNA transcritos foi determinada utilizando-se Eppendorf Realplex4 Mastercycler instrument (Eppendorf), utilizando o reagente SsoFast EvaGrenn (BioRad®), conforme as especificações do fabricante. A quantificação relativa da expressão de mRNA foi determinada por normalização com β-actina utilizando o método ΔΔCt (SEALE et al., 2011).

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados na quantificação RT-PCR.

Proteína	Gene	Forwad	Reverse
PGC1 α	Ppargc1a	CAAGCCAAACCAACAACCTTTAT CTCT	CACACTTAAGGTTTCGCTCAAT AGTC
GS	Gss	GTGCCATAGAGAACGAGCTG	ATCTCGGAAGTAAACCACAGC
GLUT3	Slc2a3	CTCATCTCCGTTGTCCTCCA	ACCACACCCGCTCCAAT
GLUT1	Slc2a1	ACCACACTCACCACACTCTG	CCTGCCAAAGCGATTAACAA
G6PD	G6pd	GGAGTTCTTTGCCCCGTAA	ATGTTCTTGGTGACTGCTTC
PFK	Pfkm	GTGACCAAAGACGTGACCAA	CAACCCGCCCTTAGAGACT
HK I	Hk1	GAACCACGAGAAGAACCAGA	CAGGCAGTCAGCGACAT
EAAT2	Slc1a2	ATACAACCAAGGCAGTCATC	ACCTAAGACATTCATCCCGT
EAAT1	Slc1a3	CCAGGCCAACGAAACAC	TGACCCCATTCACAGACC
PK	Pklr	TAAGTCTGGGATGAATGTGG	AGGTCGGTAGAGAATGGGAT
MCT-3/4	Slc16a3	TCATCACTGGCTTGGGTC	GCACAAAGGAACACGGGA
MCT-2	Slc16a7	CCTTGTTACTTCGTCCCC	TGATGTGGCCTGAGACGAG
MCT-1	Slc16a1	TGGCTATGGCAGGCAG	GACGGACGGTATCGGT
LDH-5	Ldhb	GGAATGGCTTGTGCTATC	TCGGAGTCTGGAGAAATAAG
LDH-1	Ldha	CAAACCTGCTCATCGTCTCA	ACTCTGCTACTCGTCAAAC
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Atp1a3	GAGTGCTGGGCTTCAAA	GAGTTTGCCGTAGTAGGGA
β -actina	Actb	CACCTTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG

Nota: PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; GS: Glutathione sintetase; GLUT-3: transportador de glicose 3; GLUT-1: transportador de glicose 1; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK: Fosfofrutoquinase; HK: Hexokinase-1; PK: Piruvato-kinase; Slc16a3: *solute carrier family 16 member 3*; ⁷ MCT-2: transportador de monocarboxilatos isoforma 2; MCT-1: transportador de monocarboxilatos isoforma 1; Ldhb: Lactato desidrogenase B; Ldha: Lactato desidrogenase A⁸. Slc16a7: *solute carrier family 16 member 7*; Ppargc1a: *PPARG coactivator 1 alpha*; Slc2a3: *solute carrier family 2 member 3*; Slc2a1: *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1*; Slc1a2: *solute carrier family 1 member 2*; Slc1a3: *solute carrier family 1 member 3*; Pklr: *pyruvate kinase L/R*; Slc16a1: *solute carrier family 16 member 1*.

⁷ O gene Slc16a3 é responsável ou transcrever o mRNA responsável pela tradução do transportador de monocarboxilatos isoforma 3 e 4.

⁸ As isoenzimas LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 e LDH-5 são compostas de diferentes proporções de subunidades LDH-M e LDH-H, transcritas de LDHA e LDHB, respectivamente (VALVONA et al., 2016); LDH-1 é formado apenas de subunidades LDH-H, e LDH-5 apenas de subunidades LDH-M.

QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dinâmica mitocondrial – para quantificação relativa das proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial, foram utilizadas mitocôndrias isoladas de fígado. Após isolamento, as mitocôndrias foram purificadas em gradiente de sacarose. Em um tubo de ensaio foi montado um gradiente de sacarose, primeiro adicionado 1,5mL de sacarose 60%, em seguida adicionado 4mL de sacarose 32%, 1,5mL de sacarose 23% e por último 1,5mL de sacarose 15%, as soluções de sacarose foram feitas em meio EM (EDTA – 1mM, Ácido 2- (N-morfolino) etanosulfônico, ácido 4-morfolinoetanossulfônico [MÊS] – 10mM, pH 7,2), após adição das mitocôndrias isoladas na superfície, foi realizada uma centrifugação a 45000g por 10 minutos a 4°C, então as mitocôndrias purificadas se concentraram entre as fração de 32% e 60%. Após a purificação, as mitocôndrias foram lavadas e ressuspensas com meio contendo sacarose 250 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2) e proteínas totais foram quantificadas por Bradford (BRADFORD, 1976).

Preparo das amostras – 100µg de proteínas totais foram transferidas para um microtubo, em seguida foi adicionado a uma mistura 1:1 de ureia (8M) e Tris (0,1M, pH 8.0) em mesmo volume da amostra. Após agitação foi adicionado 33µL de ditiotretiol (0,1M) e incubado por 30 minutos a 37°C com agitação (800rpm), em seguida adicionado 7µL de iodoacetomida (0,5M) e incubado por 30 minuto a 25°C com agitação (800rpm) na ausência de luz. A fim de reduzir a alcalinidade foram adicionados 740µL de Tris (100mM), em seguida adicionado 40µL de tripsina (0,1µg/µL em ácido fórmico 50 mM) e incubado a 37°C por 16 horas com agitação (800rpm), então a digestão foi interrompida com a adição de 45µL de ácido acético (20%). Para retirar às impurezas as amostras passaram por um processo de purificação com uma coluna de fase reversa (OASIS®, #186000383). Primeiro, a coluna foi condicionada com a adição de 500µL de acetonitrila, posteriormente foi adicionado 1000µL de acetonitrila 50% (duas adições de 500µL), em seguida adicionado às amostras e 500µl de acetonitrila 50%, por fim a amostra foi eluída com 600µL de acetonitrila 70% (3 adições de 200µL), o material eluído foi colocado em um

microtubo, posteriormente foi seco e ressuspensionado com 50µL da mistura acetonitrila (5%) e ácido fórmico (0,1%) (FACA et al., 2006).

Cada amostra foi injetada em triplicada, através do sistema LC-MS / MS Xevo TQS (Waters). A separação cromatográfica foi realizada através de cromatografia líquida de alta performance (I-classe, Waters) usando coluna C18 (1,8 µm de tamanho de partícula, 100 Å tamanho de poro, 1 mm x 150 mm, Waters) em um gradiente linear de 5 a 30% de acetonitrila (em água e 0,1% de ácido fórmico) ao longo de 30 min a 100 uL/min. A detecção de peptídeos foi realizada através de 3-5 fragmentos por peptídeos, durante uma janela de 2 minutos. A análise foi realizada utilizando programa Skyline 3.5 (MACLEAN et al., 2010). Lista de proteínas/peptídeos e fragmentos e suas respectivas características estão no anexo 02.

ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

As amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA (Tris - 50mM, NaCl - 150mM, EDTA [ácido etilenodiaminotetracético] - 1mM, Triton X-100 - 1%, Deoxicolato - 1%, SDS [Dodecilsulfato de sódio] - 0,1%) acrescido de inibidores (Aprotinina -5µg/mL, PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonilo] - 1mM, Leupeptina - 1µg/mL, Ortovanadato de sódio - 10,28mM, Pirofosfato de sódio - 10,09mM, Fluoreto de sódio - 100mM), em seguida centrifugado (12000g, 4°C por 40 minutos). 5 µL do homogenato foram incubadas a 37°C em tampão Tris-HCl (50 mM - pH 8.0), Triton X-100 (0.1%), oxaloacetato (250 µM), acetil-CoA (50 µM), e DTNB (ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzóico] - 100 µM). A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro a 412 nm por 10 minutos (SHEPHERD; GARLAND, 1966; SRERE, 1969; EIGENTLER et al., 2012). A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford, e a quantidade de enzima foi determinada pela fórmula abaixo.

$$\text{Unidades } (\mu\text{moles/min/mL}) = \frac{(\Delta A_{412}) / \text{min} \times V(\text{mL}) \times \text{dil}}{\epsilon^{mM} \times L(\text{cm}) \times V_{enz}(\text{mL})}$$

$\Delta A_{412}/\text{min}$ = (Absorbância final – Absorbância inicial) / (tempo final – tempo inicial); $V(\text{mL})$ = Volume do teste: em placa de 96 poços é 0,2mL; em cubeta é 2mL; dil = Volume do teste (mL)/ volume da amostra (mL); ϵ^{mM} = Coeficiente de extinção molar (13,6 mM⁻¹. cm⁻¹); L = Caminho ótico: em placa de 96 poços é 0,552cm; em cubeta é 1cm; V_{enz} = volume da amostra.

ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da catalase foi medida de acordo com o método descrito por Aebi (AEBI, 1984), monitorando o desaparecimento de H_2O_2 em 230 nm. Os resultados foram expressos como U / mg de proteína. As amostras (15 mg) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão RIPA, em seguida foram centrifugados a 10 000 g durante 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para a análise. 20 μL foram incubados com 180 μL de tampão Tris-EDTA (Tris 1 M, EDTA 5 mM) acrescido de H_2O_2 (10 mM) durante 20 minutos a 37°C, após o período de incubação foi determinada a absorbância das amostras a cada 1 minuto durante 5 minutos. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 por minuto (KITANI et al., 1998). Para medida dessa atividade foi utilizada placa de 96 poços com fundo transparente específico para comprimentos de ondas ultravioleta (até 400nm).

ATIVIDADE DA SUPEROXIDISMUTASE – SOD

A atividade da SOD foi determinada utilizando-se o *Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit - Cayman Chemical Company*®, o qual utiliza o sal tetrazólio para detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. O kit permite a mensuração da atividade dos três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e FeSOD). Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzimas necessárias para apresentar 50% da dismutação do radical superóxido. As amostras (15 mg) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão RIPA, em seguida foram centrifugados a 10 000 g durante 20 min a 4°C e 10 μL dos sobrenadantes foram utilizados para a análise. A absorbância de leitura foi de 460 nm, os resultados foram expressos como U / mg de proteína.

DETERMINAÇÃO DE LACTATO

O lactato foi considerado por muito tempo como um produto da glicólise anaeróbia com nenhuma função no metabolismo, porém nos últimos anos tem se mostrado sua importância na ativação neuronal (BÉLANGER et al., 2011). Para mensuração da concentração as amostras (15 mg) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão RIPA, em seguida foram centrifugados a 10 000 g durante 20 min a 4°C e 40 μL dos sobrenadantes foram utilizados para a análise utilizando kit Lactato Enzimático | Labtest (Labtest Diagnostica SA, Brasil).

RESULTADOS

Metabolismo Corporal, metabolismo de glicose e lipídeos, desempenho físico e movimentação, ingestão alimentar e hídrica

Primeiramente, monitoramos do metabolismo corporal de WAR utilizando a calorimetria indireta, a qual estima o metabolismo por meio das medidas dos volumes de oxigênio consumido (VO_2) e gás carbônico produzido (VCO_2). Esses valores também permitem o cálculo do coeficiente respiratório ($RQ = VCO_2/VO_2$) e do gasto energético total (EE) (**figura 3**). Podemos observar que os animais da cepa WAR apresentam redução no volume de CO_2 produzido tanto no período ativo (escuro) quanto no inativo (claro), acarretando na redução nos valores de RQ (10%) e EE (8% e 6,5% no período claro e escuro, respectivamente).

Figura 3: Medida do (A) volume de O_2 inspirado (VO_2), (B) volume de CO_2 expirado (VCO_2), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) de animais Wistar e da cepa WAR. Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar nos respectivos períodos; Média $\pm$ erro padrão. $n = 10$.

Durante o mesmo período de monitoramento por calorimetria indireta, mensuramos o nível de movimentação horizontal e vertical. Como mostra a **figura 4**,

animais da cepa WAR possuem menor atividade exploratória (movimentação horizontal) em ambos os períodos (33% e 47% no período claro e escuro, respectivamente), porém uma maior (113%) movimentação vertical no período inativo (claro).

Figura 4: Medida da (A) movimentação horizontal e (B) movimentação vertical de animais Wistar e da cepa WAR. Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar, ** $P < 0,01$, nos respectivos períodos; Média $\pm$ erro padrão. $n = 10$.

Visto que animais da cepa WAR possuem menor massa corporal quando comparados aos animais Wistar com mesmo período de vida, supomos que estes animais podem ter deficiências na absorção de nutrientes. Assim mensuramos a ingestão alimentar e hídrica, bem como a massa fecal e volume urinário (**figura 5**), porém notamos que animais da cepa WAR possuem uma maior ingestão alimentar (27%), hídrica (52%), massa fecal (27%) e volume urinário (34%). O aumento das fezes e volume urinário podem ser reflexo da maior ingestão alimentar e hídrica. Mensuramos também a concentração das principais biomoléculas nas fezes e encontramos valores semelhantes entre Wistar e WAR (**Tabela 3**). Assim descartamos a possibilidade dos animais da cepa WAR serem mais magros por possuírem deficiência na absorção de alguma das principais biomoléculas.

Figura 5: Medida diária da (A) ingestão alimentar, (B) ingestão hídrica, (C) massa fecal e (D) volume urinário de animais Wistar e WAR mensurados durante sete dias. Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar, ** $P < 0,01$ vs Wistar, *** $P < 0,001$ vs Wistar; Média $\pm$ erro padrão. $n = 5$.

Tabela 3: Quantificação da composição fecal e urinária de ratos Wistar e WAR.

	Wistar (n=8)	WAR (n=8)
Carboidratos fecais (mg/g)	0,191 $\pm$ 0,023	0,211 $\pm$ 0,023
Aminoácidos fecais (mg/g)	1,713 $\pm$ 0,139	1,759 $\pm$ 0,111
Lipídeos fecais (mg/g)	2,286 $\pm$ 0,324	2,268 $\pm$ 0,383
Ureia urinária (g/24 horas)	0,413 $\pm$ 0,021	0,407 $\pm$ 0,025

Valores representados em média $\pm$ erro padrão; n= número de animais.

Na **tabela 4** são apresentados os resultados da avaliação do desempenho físico de animais Wistar e WAR, sendo os valores referentes à distância total percorrida, velocidade final alcançada e tempo total em que os animais entraram em exaustão durante o teste incremental de carga. O experimento consistiu de período de ambientação durante a primeira semana e, passadas 24h da última sessão de

ambientação, foi realizado o teste incremental de carga. Esse teste se caracteriza por incrementos de velocidade de 0,2 km/h (3 m/min) a cada 3 minutos, com velocidade inicial de 0,3 km/h. Como demonstrado os animais WAR apresentaram maior capacidade de tolerância ao teste de desempenho físico tanto na condição pós-prandial quanto na condição de jejum.

Tabela 4: Parâmetros de desempenho físico em animais Wistar e WAR submetidos ao teste incremental de carga.

		Wistar (n=8)	WAR(n=8)
Alimentados	Distância percorrida (m)	435.60 ± 14.99	649.40 ± 55.00**
	Velocidade máxima alcançada (m/min.)	30.20 ± 0.73	36.60 ± 2.22*
	Tempo percorrido (segundos)	1636 ± 28.04	1962 ± 97.03*
Jejum de 15 horas	Distância percorrida (m)	475.40 ± 8.12	822.30 ± 79.61*
	Velocidade máxima alcançada (m/min.)	31.40 ± 0.40	40.40 ± 2.20**
	Tempo percorrido (segundos)	1683 ± 8.539	2262 ± 121.3**

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar.

O teste de tolerância a insulina (ITT) é um exame laboratorial que verifica a resistência à insulina através de coletas de sangue em jejum e em intervalos regulares após aplicação de insulina exógena. Os dados referentes ao ITT foram utilizados para cálculo do Kitt, sendo a interpretação do Kitt como quanto mais rápida e intensa for a queda da concentração da glicose, mais sensível à insulina o indivíduo é. Assim, quanto maior o Kitt, maior a sensibilidade à insulina. Em relação a esse parâmetro não observamos diferença entre os grupos Wistar e WAR (**figura 6**).

Figura 6: Taxa de desaparecimento da glicose sérica (Kitt), referente ao teste de tolerância a insulina. Análise estatística: Teste t-Student. Média $\pm$ erro padrão. n = 7.

O perfil sanguíneo reflete a capacidade dos tecidos tanto em estocar substratos energéticos quanto em metabolizar/excretar metabólicos tóxicos ou que estão em grande concentração intracelular (**tabela 5**). Podemos observar que animais WAR possuem menor concentração de colesterol total (24%), e de triglicerídeos circulantes (33%), contudo maior concentração de colesterol HDL (33%). Os animais WAR também apresentam níveis glicêmicos 12% maiores no estado de jejum (15 horas). Na **tabela 5** também são apresentados os valores de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e ureia sanguínea; ALT e AST são marcadores de danos hepáticos e a ureia sanguínea pode ser usada como marcador de proteólise. Como observado não há diferença significativa na concentração desses marcadores entre os grupos. O fato de os animais WAR apresentarem maior desempenho no teste incremental de carga poderia estar relacionado à uma maior concentração de hemoglobina no sangue, o que facilitaria o transporte de oxigênio para as células musculares. No entanto, valores semelhantes de concentração de hemoglobinas foram encontrados entre os grupos, assim como não foi observada diferença nas concentrações de leucócitos e eritrócitos.

Tabela 5: Concentrações sanguíneas de lipídios, ureia, enzimas hepáticas, células sanguíneas e glicose de animais Wistar e WAR.

	Wistar (n=8)	WAR (n=8)
Colesterol Total (mg/dL)	64,36 ± 4,80	48,51 ± 2,74*
HDL (mg/dL)	21,66 ± 2,23	28,88 ± 1,89*
Triglicerídeos (mg/dL)	114,90 ± 13,77	75,96 ± 12,07*
Urea plasmática (mg/dL)	55,77 ± 1,33	53,23 ± 3,07
Alanina aminotransferase (U/L)	50,62 ± 2,62	44,04 ± 5,06
Aspartato aminotransferase (U/L)	98,55 ± 6,83	108,90 ± 7,19
Glicemia em jejum (mg/dL)	64,83 ± 2,24	73,17 ± 2,45*
Leucócitos ⁹ (10 ⁹ /L)	11,10 ± 0,10	12,27 ± 1,22
Eritrócitos ⁶ (10 ⁶ /mm)	8,76 ± 0,48	8,558 ± 0,15
Hemoglobina (g/dL)	16,37 ± 0,92	15,33 ± 0,21

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar.

Aos os 80 dias de vida e após a realização dos testes in vivo, os animais foram eutanasiados e os tecidos foram retirados, pesados e relacionados ao peso corporal. Também foi mensurado a distância reto-nasal, para cálculo o índice de Lee, com o qual pode-se inferir informações sobre o desenvolvimento do animal. Animais WAR apesar de apresentarem menor massa corporal (40%), apresentaram maior massa hepática (27%) e menor massa de músculo sóleo (relacionada à massa corporal – 25%, ou relacionada ao tamanho da tíbia – 95%) (**tabela 6**). WAR também apresentaram menor valor ao índice de Lee (7,6%), o que sugere uma deficiência no desenvolvimento dos animais.

Tabela 6: Massa relativa dos tecidos e índice de Lee de animais Wistar e WAR.

	Wistar (n=8)	WAR (n=8)
Massa corporal (g)	447,3 ± 16,72	265,3 ± 6,487***
Fígado	3,733 ± 0,258	4,758 ± 0,298*
Sóleo	0,130 ± 0,005	0,097 ± 0,001***
Gastrocnêmio	1,243 ± 0,062	1,288 ± 0,031
Coração	0,352 ± 0,020	0,376 ± 0,015
Epipididimal	1,258 ± 0,124	1,026 ± 0,020
Retroperitoneal	1,218 ± 0,131	0,942 ± 0,074
Perirrenal	0,269 ± 0,031	0,297 ± 0,022
Sóleo/ Tibia (g/mm)	0,1277 ± 0,0003	0,0062 ± 0,0002***
Índice de Lee	305,7 ± 2,9	282,5 ± 4,7***

Valores expressos em relação a massa corpórea. Média ± erro padrão. n= número de animais. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar.

Com relação aos substratos energéticos e composição tecidual, verificamos que animais WAR possuem maiores concentrações de glicogênio nos tecidos hepático e músculo sóleo (96% e 152%, respectivamente), porém não apresentam diferenças em proteínas e lipídios em relação aos animais Wistar (**tabela 7**).

Tabela 7: Composição dos tecidos hepático e musculares – sóleo e coração animais Wistar e WAR.

	Wistar (n=7)	WAR (n=8)
Fígado		
Glicogênio	7,97 ± 2,38	15,65 ± 2,67*
Proteínas	6,18 ± 0,29	6,39 ± 0,24
Lipídios	53,15 ± 2,88	52,09 ± 2,16
Músculo sóleo		
Glicogênio	0,23 ± 0,02	0,58 ± 0,13*
Proteínas	5,42 ± 0,24	5,38 ± 0,18
Lipídios	27,10 ± 8,94	30,79 ± 3,37
Coração		
Glicogênio	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,01
Proteínas	4,73 ± 0,52	4,08 ± 0,82
Lipídios	17,41 ± 1,67	21,66 ± 5,31

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar.

Metabolismo mitocondrial nos tecidos hepático, sóleo e cardíaco

Após a eutanásia, biopsias dos tecidos foram utilizadas para mensurar o consumo de oxigênio (**figura 7**). As biopsias de animais WAR apresentaram maior consumo de oxigênio nos estados *NADH-Linked* no tecido hepático (128%), *OXPHOS* nos tecidos hepático, sóleo e cardíaco (136%, 46% e 53%, respectivamente) e *ETS* (135%, 96% e 93%, respectivamente) em relação aos animais Wistar. Quando observamos as razões entre os estados respiratórios (**tabela 8**), observamos que os animais WAR apresentam menor grau de desacoplamento (*LEAK/ETS*) nos tecidos hepático, sóleo e cardíaco, e maior capacidade em fosforilar ATP (*OXPHOS/LEAK*) nos tecidos hepático e cardíaco.

Figura 7: Taxas respiratórias de biopsias de fígado (A), músculo sóleo (B) e coração (C) de animais Wistar e WAR, nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L) e ETS (E). Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar; Média $\pm$ erro padrão. $n = 5$.

Tabela 8: Razões respiratórias de biopsias de fígado, músculos sóleo e cardíaco e mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar.

	Wistar (n=8)	WAR (n=8)
Fígado		
<i>L/E</i>	0,321 ± 0,028	0,116 ± 0,016**
<i>P/E</i>	0,732 ± 0,042	0,733 ± 0,042
<i>P/L</i>	2,296 ± 0,135	6,273 ± 0,102***
Mitocôndria isolada de fígado		
<i>L/E</i>	0,156 ± 0,013	0,190 ± 0,008*
<i>P/E</i>	1,380 ± 0,136	1,805 ± 0,053**
<i>P/L</i>	8,803 ± 0,579	9,562 ± 0,301
Músculo sóleo		
<i>L/E</i>	0,314 ± 0,074	0,168 ± 0,014**
<i>P/E</i>	0,589 ± 0,055	0,528 ± 0,029
<i>P/L</i>	1,852 ± 0,183	3,717 ± 0,345**
Coração		
<i>L/E</i>	0,190 ± 0,019	0,127 ± 0,004
<i>P/E</i>	0,551 ± 0,038	0,437 ± 0,039
<i>P/L</i>	2,892 ± 0,234	3,413 ± 0,353

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar.

Nos últimos anos tem se evidenciado que as EROS atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares (RHEE et al., 2005). Porém quando há produção excessiva seguida de uma insuficiente taxa de remoção dessas espécies, danos oxidativos podem ser ocasionados (OTT et al., 2007). A fim de analisar o estado redox de órgãos de animais WAR, quantificamos a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), a concentração de proteínas carboniladas e a produção de H₂O₂. Como demonstrado na **figura 8**, animais WAR apresentam maior taxa na produção de H₂O₂ nos tecidos

hepático, sóleo e cardíaco (96%, 161% e 103%, respectivamente), menor razão GSH/GSSG tecidos hepático e sóleo (42% e 17%, respectivamente) e maior concentração de proteínas carboniladas (140%) no músculo sóleo indicando um estado mais oxidado quando comparado aos ratos Wistar.

Figura 8: Estado REDOX hepático e musculares – sóleo e coração - de animais da cepa WAR e Wistar. (A) produção de H₂O₂, (B) razão GSH/GSSG e (C) proteína carbonilada. Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar; **P<0,01 vs Wistar. Média ± erro padrão. n = 8.

A enzima citrato sintase é uma enzima transferase que controla o primeiro passo ciclo de Krebs também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou tri-carboxílico. A citrato sintase está localizada na matriz mitocondrial, porém é codificada pelo DNA nuclear e não pelo DNA mitocondrial. A presença da enzima é comumente utilizada

como marcador quantitativo de mitocôndria intacta (WILLIAMS et al., 1986; WILMORE; COSTILL, 2009). Como demonstrado na **figura 9**, animais WAR apresentam maior concentração da enzima nos tecidos hepático, sóleo e coração (21%, 36% e 158%, respectivamente), indicando maior densidade mitocondrial. Esse resultado corroborando com os resultados de maior capacidade de transporte de elétrons (estado ETS) e fosforilação (estado OXPHOS) observada nos experimentos de consumo de oxigênio. Essa interpretação é ainda reforçada pelo aumento na expressão relativa de RNAm do co-ativador de transcrição gênica PGC-1 α , o qual é relacionado ao processo de biogêneses mitocondrial (**figura 10**).

Figura 9: Concentração da enzima citrato sintase no fígado e músculos (sóleo e cardíaco) de animais da cepa WAR e Wistar. Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar; *** $P < 0,001$ vs Wistar. Média $\pm$ erro padrão. $n = 8$.

Figura 10: Expressão relativa de PGC1 α : β -actina nos tecidos hepático e musculares (sóleo e cardíaco) de animais da cepa WAR e Wistar. Análise estatística: Teste t-Student. * $P < 0,05$ vs Wistar; Média $\pm$ erro padrão. $n = 5$.

Para verificar se o maior consumo de oxigênio tecidual é devido a maior densidade mitocondrial, mensuramos o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado (**figura 11**). As mitocôndrias isoladas de fígado de animais WAR apresentam maior velocidade de fosforilação (25%), maior capacidade de fosforilar ADP por átomo de oxigênio (razão ADP/O – 9%) e, de forma diferente da biopsia, as mitocôndrias isoladas de WAR não apresentaram elevada produção de H₂O₂. Observando a **tabela 7**, onde estão descritas as razões entre os estados respiratórios, notamos que as mitocôndrias de animais WAR apresentam maior grau de desacoplamento (LEAK/ETS – 21%), maior capacidade em fosforilar o ADP (razão OXPHOS/ETS – 30%), e maior qualidade mitocondrial (razão OXPHOS/LEAK – 8%).

Figura 11: (A) Valores dos estados respiratórios de mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar nos estados OXPHOS (P), LEAK (L), (B) razão ADP/O; (C) produção de H₂O₂. Análise estatística: Teste t-Student. *P<0,05 vs Wistar; Média ± erro padrão. n = 5.

Utilizando a espectrometria de massa, quantificamos as proteínas envolvidas no processo de dinâmica mitocondrial (fusão -mitofusina 1, mitofusina 2 e Fis1; fissão - OPA-1), no desacoplamento mitocondrial (UCP-1, UCP-2 e UCP-3), no transportes de biomoléculas (VDAC1, VDAC2 e VDAC3 – que também são utilizadas como proteínas constitutivas), na cadeia de transporte de elétrons (NQO 1 e NQO 2), OXPHOS (ATP5B e ATP1A) e ciclo de Krebs (malato desidrogenase 2) em mitocôndrias isoladas de fígado (**Figura 12**). Com exceção das proteínas constitutivas, a quantificação relativa demonstrou um aumento significativo da concentração de todas essas proteínas nas mitocôndrias de WAR, fortalecendo os resultados anteriores de respiração tecidual e mitocondrial. Ainda, indica que o aumento da densidade mitocondrial leva ao aumento da dinâmica mitocondrial. Este é o processo pelo qual mitocôndrias com baixo potencial de membrana e/ou com vazamento de prótons são recicladas. Essas mitocôndrias são

destinadas ao processo de fusão com mitocôndrias novas (biogênese), com o intuito de reciclar a porção onde ainda há potencial de membrana. Após a fusão elas são fissionadas originando a duas novas mitocôndrias, uma com alta capacidade fosforilativa (com alto potencial de membrana) e outra sem potencial de membrana destinada ao processo de mitofagia.

Figura 12: Quantificação relativa das proteínas envolvidas no processo de fusão/fissão mitocondrial, composição do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons, OXPHOS, em amostras de mitocôndrias isoladas de fígado de animais da cepa WAR e Wistar. mitofusina 2 (Mfn2), mitofusina 1 (Mfn1), *Optic Atrophy-1* (OPA 1), Proteína mitocondrial de fissão 1 (Fis1), malato desidrogenase 2 (M.D.), quinona oxidoreductase 1 (NQO1), quinona oxidoreductase 2 (NQO2), ATPase transportadora de sódio / potássio, proteína de tipo alfa (ATP1A), Subunidade beta, ATP sintase (ATP5B), proteína de desacoplamento 1 (UCP-1), proteína de desacoplamento 2 (UCP-2), proteína de desacoplamento 3 (UCP-3), proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 1 (VDAC 1), Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 2 (VDAC 2), Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 3 (VDAC 3). Análise estatística: Teste t-Student. * P<0,05 vs Wistar, **P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar; média ± erro padrão. n=6.

Ainda utilizando a metodologia de espectrometria de massas fizemos a quantificação relativa das proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e proteínas em lisado hepático (**figura 13**). Observamos um aumento no conteúdo de proteínas da via glicolítica, da via de transaminação de aminoácidos e mTOR (síntese proteica).

Figura 13: Quantificação relativa das proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e proteínas em lisado hepático de animais da cepa WAR e Wistar. Frutose-1,6-Bisfosfatase 1 (FBP1), Fosfoenolpiruvato carboxikinase 1 (PCK1), Glicerol-3-fosfato desidrogenase 1 (GPD1), Piruvato carboxilase (PC), Transaminase glutâmica pirúvica (GPT), Glutamato Oxalacetato Transaminase 1 (GOT1), Glutamato Oxalacetato Transaminase 2 (GOT2), *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Análise estatística: Teste t-Student. *P<0,05 vs Wistar, *P<0,01 vs Wistar, ***P<0,001 vs Wistar; média ± erro padrão. n = 6.

***Kindling* audiogênico e metabolismo mitocondrial cerebral**

O metabolismo mitocondrial foi estudado nas regiões cerebrais do hipocampo e córtex de animais foram submetidos ou não ao *kindling* audiogênico. A **figura 14** apresenta a variação dos índices de severidade categorizado (ISc) das crises mesencefálicas dos animais WAR, sendo que os animais wistar submetidos ao mesmo procedimento não apresentaram comportamento convulsionante. Esses resultados estão de acordo os observados em trabalhos anteriores (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983, 1989, 1991, TERRA; GARCIA-CAIRASCO, 1992, 1994; GARCIA-CAIRASCO; DORETTO; et al., 1996; DORETTO et al., 2002, 2009; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003; ROMCY-PEREIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2003; MAGALHÃES et al., 2004; GALVIS-ALONSO et al., 2004; ROSSETTI et al., 2006; PEREIRA et al.,

2008; GITAÍ et al., 2011, 2009; GUEDES et al., 2009; CUNHA et al., 2015; TOTOLA et al., 2017; CASTRO et al., 2017).

Figura 14: Índices de severidade categorizado (ISc) das crises mesencefálicas dos animais WAR submetidos ao *kindling* audiogênico (n=8) no decorrer dos 20 estímulos acústicos.

Vinte e quatro horas após o último estímulo sonoro do *kindling* audiogênico, os animais foram eutanasiados, as regiões do cérebro foram separadas e o consumo de oxigênio mensurado imediatamente (**figura 15**). Os hipocampus de animais WAR apresentaram maior consumo de oxigênio nos estados *NADH-Linked* (202%) e *ETS* (104%) quando comparados aos de ratos Wistar (**figura 15A**). Nos animais Wistar, o *kindling* audiogênico (*Wistar-kindling*) promoveu um aumento no consumo de oxigênio nos estados *NADH-Linked* (370%), *OXPHOS* (157%) e *LEAK* (290%). Nos animais WAR (*WAR-Kindling*) o *kindling* audiogênico não promoveu alterações significativas.

No córtex (**figura 15B**), os animais WAR não apresentam diferenças no consumo de O_2 em relação aos Wistar. Contudo, após o *kindling* audiogênico o consumo de oxigênio pelo córtex de animais Wistar foi estimulado de forma semelhante a região hipocampo (aumento nos estados *NADH-Linked*, *P* e *L*). Nos córtex de animais WAR (*WAR-Kindling*) o *kindling* audiogênico não promoveu alterações significativas.

Figura 15: Taxas respiratórias de biopsias de hipocampo (A) e córtex (B) de animais Wistar e WAR submetidos ou não ao *kindling* audiogênico, nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L), ETS (E). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Apesar do maior consumo de oxigênio dos animais WAR em relação ao Wistar na região hipocampo, não observamos diferenças nas razões respiratórias entre os grupos (**tabela 9**). Contudo o *kindling* audiogênico induziu aumento no grau de desacoplamento (L/E) e fosforilação (P/E) em hipocampus de ratos Wistar (Wistar-*kindling*). No córtex foi apenas observado redução de 20% na razão P/L. Nos animais WAR (WAR-*Kindling*) o *kindling* audiogênico não promoveu alterações significativas.

Tabela 7: Razões respiratórias de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar submetidos ou não ao *kindling* audiogênico.

	Wistar (n=8)	WAR (n=8)	Wistar- <i>Kindling</i> (n=7)	WAR- <i>Kindling</i> (n=7)
Hipocampo				
<i>L/E</i>	0,243 ± 0,036 ^{a, b}	0,272 ± 0,091	0,530 ± 0,121 ^{a, b, d}	0,415 ± 0,119 ^{b, d}
<i>P/E</i>	0,558 ± 0,036 ^a	0,595 ± 0,058 ^b	0,821 ± 0,037 ^{a, b, c}	0,635 ± 0,052 ^c
<i>P/L</i>	2,291 ± 0,473	2,095 ± 0,319	1,513 ± 0,079	1,681 ± 0,105
Córtex				
<i>L/E</i>	0,490 ± 0,043	0,428 ± 0,029 ^a	0,625 ± 0,029 ^a	0,475 ± 0,054
<i>P/E</i>	0,772 ± 0,097	0,680 ± 0,049	0,861 ± 0,047	0,674 ± 0,052
<i>P/L</i>	1,664 ± 0,102 ^a	1,597 ± 0,059	1,345 ± 0,025 ^a	1,417 ± 0,087

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: one-way ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); letras semelhantes representam diferenças significativas.

Corroborando com os resultados de consumo de oxigênio, animais WAR apresentaram maior densidade mitocondrial (unidades de citrato sintase) nas regiões hipocampo e córtex (165% e 75%, respectivamente) em relação aos Wistar; o *kindling* audiogênico elevou a densidade mitocondrial apenas nos animais Wistar (Wistar-*kindling*) na região hipocampo (133%) (**figura 16**).

Adicionalmente avaliamos as concentrações de lactato para averiguar o metabolismo de glicose no cérebro (**figura 18**). Podemos observar que apenas no hipocampo os WAR apresentam maiores concentrações de lactato (70%) em relação ao Wistar. O *kindling* audiogênico aumentou 124% a concentração de lactato apenas no grupo Wistar (Wistar-*kindling*).

Figura 16: Quantificação da enzima citrato sintase em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar submetidos ou não ao *kindling* audiogênico. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); letras semelhantes representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Com relação ao estado REDOX (**figura 17**), podemos observar que animais WAR possuem reduzida razão GSH/GSSG nas regiões do hipocampo e córtex (36% e 32%, respectivamente) e aumento nas concentrações de proteína carbonilada na região hipocampo (48%). O *kindling* audiogênico reduziu GSH/GSSG nas regiões hipocampo (62%) e córtex (23%) nos grupos Wistar-*kindling* em relação ao Wistar e aumentou as concentrações de proteína carbonilada nessas mesmas regiões. Com relação às enzimas antioxidantes, podemos observar que ratos Wistar e WAR possuem semelhantes concentrações de catalase no hipocampo e córtex, e que o *kindling* audiogênico reduziu essas concentrações em ambas as regiões cerebrais de Wistar-*kindling* e WAR-*kindling*. Nenhuma diferença foi notada nas concentrações de SOD em ambos os grupos tratados ou não.

Figura 17: Estado REDOX de biopsias cerebrais (Hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e Wistar submetidos ou não ao *kindling* audiogênico. (A) razão GSH/GSSG; (B) concentração de catalase; (C) concentração de superóxido-dismutase (SOD) e (D) concentração de proteína carbonilada. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); letras semelhantes representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Figura 18: Quantificação de lactato, em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR e controle, com 80 dias de vidas após serem submetidos ao *kindling* audiogênico. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Importância do metabolismo mitocondrial e das EROs na crise epilética de WAR

Para verificar se o metabolismo mitocondrial contribui para a crise epilética de WAR e se essa contribuição inclui a geração de EROs, tratamos os WAR de 40 dias com DNP, um desacoplador químico clássico, com o intuito de reduzir a geração mitocondrial de ATP e EROs; ou tratamos com NAC, um potente agente redutor antioxidante. O tratamento com DNP aumentou a ingestão hídrica (38%) enquanto o tratamento com NAC promoveu redução de 23%. Com base na ingestão hídrica, calculamos que os animais do grupo WAR-DNP ingeriram $19,84 \pm 1,38 \mu\text{g}$ DNP/100g/dia, enquanto que os WAR-NAC ingeriram $20,37 \pm 0,37 \text{ mg}$ NAC/100g/dia (**tabela 10**). Entre o 30° e 36° de tratamento com NAC ou DNP avaliamos o metabolismo corporal por calorimetria indireta (**figura 19**). Podemos observar que o tratamento com DNP não aumentou o metabolismo corporal dos animais WAR, conforme esperado. Já o tratamento com NAC induziu aumento nos valores de VO_2 (13% e 6,5% nos períodos claros e escuros, respectivamente) e VCO_2 (19% e 24% nos períodos claros e escuros, respectivamente), os quais não foram suficientes para elevar o gasto energético total (EE) e nem o coeficiente respiratório (RQ). Durante o mesmo período, mensuramos o nível de movimentação horizontal e vertical (**figura 20**) e verificamos que enquanto o tratamento com DNP não induziu alterações nesses comportamentos, o tratamento com NAC induziu um aumento de 62% na atividade exploratória (movimentação horizontal) apenas no período claro.

A **figura 21** mostra os valores referente ao índice de severidade categorizado (ISc) antes e após tratados com DNP ou NAC. Podemos observar que animais WAR (sem tratamento) tiveram a sensibilidade a epilepsia aumentada no decorrer do tempo, entre 40 dias (ISc = 4,2) e 80 dias ($7,25 \pm 0,16$) de vida. O tratamento com DNP não alterou o ISc ($7,00 \pm 0,21$), porém o tratamento com NAC foi capaz de reduzir em 20% a severidade das crises epiléticas (ISc = $5,80 \pm 0,57$).

Após 40 dias de tratamento ou não com DNP ou NAC, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado e os tecidos retirados e pesados. Não observamos diferença nas massas dos tecidos (**tabela 10**) nem alterações nas concentrações de lipídios, enzimas de dano hepático e glicose circulantes (**tabela 11**) entre os 3 grupos.

Tabela 8: Massa dos tecidos de animais WAR tratados com DNP ou NAC.

	WAR (n=8)	WAR-DNP (n=7)	WAR-NAC (n=7)
Massa corporal (g)	$327,8 \pm 9,308$	$311,4 \pm 12,99$	$308,2 \pm 13,94$
Fígado	$3,726 \pm 0,149$	$4,029 \pm 0,161$	$4,188 \pm 0,063$
Sóleo	$0,105 \pm 0,003$	$0,103 \pm 0,003$	$0,113 \pm 0,007$
Gastrocnemius	$1,188 \pm 0,035$	$1,010 \pm 0,086$	$1,153 \pm 0,089$
Ingestão hídrica (mL/100g/dia)	$13,34 \pm 0,22^{a, b}$	$18,49 \pm 0,34^a$	$10,19 \pm 0,18^b$

Valores expressos em relação a massa corpórea. Média $\pm$ erro padrão. n= número de animais. Análise estatística: one-way ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey). Letras semelhantes representam diferenças significativas.

Figura 19: (A) volume de O₂ inspirado (VO₂), (B) volume de CO₂ expirado (VCO₂), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) de animais da cepa WAR e Wistar, com 80 dias de vidas submetidos ou não ao tratamento com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas. Média ± erro padrão. n = 7.

Figura 20: Medida do (A) movimentação horizontal, (B) movimentação vertical de animais da cepa WAR após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média ± erro padrão. n = 7.

Tabela 9: Concentrações de lipídios, ureia, enzimas de dano hepático e glicose em plasma de animais WAR tratados ou não com DNP ou NAC.

	WAR (n=7)	WAR-DNP (n=7)	WAR-NAC (n=7)
Colesterol Total (mg/dL)	47,23 ± 2,29	49,215 ± 2,09	46,74 ± 1,55
Triglicerídeos (mg/dL)	65,41 ± 4,08	63,57 ± 4,42	73,97 ± 3,47
Ureia plasmática (mg/dL)	46,38 ± 0,22	47,25 ± 0,28	46,91 ± 0,62
Alanina aminotransferase (U/L)	55,88 ± 5,20	58,68 ± 6,34	71,24 ± 7,42
Aspartato Aminotransferase (U/L)	107,77 ± 8,29	111,70 ± 8,88	116,35 ± 14,33
Glicemia (mg/dL)	76,17 ± 1,43	80,33 ± 6,30	81,52 ± 5,71

Valores expressos em relação a massa corpórea. Média ± erro padrão. n= número de animais. Análise estatística: one-way ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey). Letras semelhantes representam diferenças significativas.

Figura 21: Índices de severidade categorizado (ISC) das crises mesencefálicas dos animais WAR submetidos antes e após serem tratados com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média ± erro padrão. n = 7.

Nas regiões do hipocampo e córtex foi monitorado o consumo de oxigênio (**figura 21**). Podemos observar que o tratamento com NAC não induziu alterações nos estados respiratórios, porém como esperado o tratamento com DNP induziu aumento no estado L nas regiões hipocampo e córtex (59% e 119%, respectivamente), indicando desacoplamento.

Figura 22: Taxas respiratórias de biopsias de hipocampo (A) e córtex (B) de animais da cepa WAR tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC), nos estados NADH-Linked, OXPHOS (P), LEAK (L), ETS (E). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Apesar do WAR-DNP apresentar valores de estado *L* mais elevados em ambas regiões, observamos aumento significativo no índice de desacoplamento apenas na região hipocampo (43%) (**tabela 12**).

Tabela 10: Fluxo de controle respiratório de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC).

	WAR (n=7)	WAR-DNP (n=7)	WAR-NAC (n=7)
Hipocampo			
<i>L/E</i>	0,218 $\pm$ 0,019 ^a	0,313 $\pm$ 0,023 ^{a, b}	0,213 $\pm$ 0,031 ^b
<i>P/E</i>	0,429 $\pm$ 0,021	0,500 $\pm$ 0,046	0,448 $\pm$ 0,038
<i>P/L</i>	2,729 $\pm$ 0,840	1,633 $\pm$ 0,146	2,019 $\pm$ 0,253

	Córtex		
<i>L/E</i>	0,347 ± 0,015	0,438 ± 0,017	0,352 ± 0,046
<i>P/E</i>	0,531 ± 0,032	0,584 ± 0,038	0,599 ± 0,063
<i>P/L</i>	1,679 ± 0,148	1,508 ± 0,047	1,628 ± 0,198

Valores representados em média ± erro padrão; n= número de animais. Análise estatística: one-way ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas.

Podemos observar que os tratamentos com DNP ou NAC induziram um aumento ainda maior na densidade mitocondrial de WAR: NAC nas regiões do hipocampo e córtex (108% e 133%, respectivamente), enquanto DNP apenas no córtex (41%) (**figura 23**). NAC reduziu em 50% as concentrações de lactato apenas no hipocampo, enquanto que o tratamento com DNP as reduziu em 64% e 15% na região do hipocampo e córtex, respectivamente (**figura 25**).

Figura 23: Concentração de citrato sintase em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas. Média ± erro padrão. n = 7.

Com relação ao estado REDOX, podemos observar que os tratamentos com DNP ou NAC reduziram a geração de H₂O₂ e as concentrações de proteínas carboniladas, e aumentaram a razão GSH/GSSH nas regiões hipocampo e córtex de WAR (**figura 24**). NAC ainda elevou os níveis de catalase no hipocampo e córtex, enquanto que ambos os tratamentos elevaram SOD no córtex.

Figura 24: Estado REDOX de biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) e N-acetilcisteína (NAC). (A) produção de H_2O_2 , (B) razão GSH/GSSG e (C) proteína carbonilada. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Figura 25: Concentrações de lactato em biopsias cerebrais (hipocampo e córtex) de animais da cepa WAR tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC). Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Podemos observar nas figuras seguintes as diferenças na expressão relativa de RNAm de diversos genes na região do hipocampo (**figura 26**) e córtex (**figura 27**). Em ambas as regiões observamos aumento da expressão de gene relacionado ao metabolismo de carboidratos – transportadores de glicose e glicólise – em animais WAR comparados ao Wistar, além dos transportadores de aminoácidos excitatórios – EAAs – indicando maior sinapse. Ambos os tratamentos, porém com maior significância o tratamento com NAC induziu redução no GLUT-1 (presente nos astrócitos) e nas enzimas que compõem a glicólise, além das LDH, indicando que a redução de captação de glicose pelo astrócito é capaz de alterar a bioenergética em ambas as células, reduzindo a sinapse dos neurônios, e como consequência reduzindo a severidade/gravidade da crise epilética.

Figura 26: Expressão relativa de RNAm em relação a β -actina na região do hipocampo de animais da cepa WAR e Wistar tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC). GLUT-3: transportador de glicose 3; GLUT-1: transportador de glicose 1; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK: Fosfofrutoquinase; HK: Hexokinase-1; PK: Piruvato-quinase; PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; GS: Glutamina sintetase; EAAT1: *Excitatory Amino Acid Transporter 1*; EAAT2: *Excitatory Amino Acid Transporter 2*; LDH-5: Lactato desidrogenase 5; LDH-1: Lactato desidrogenase 1; MCT-1: transportador de monocarboxilatos isoforma 1; MCT-2: transportador de monocarboxilatos isoforma 2; MCT-3/4: transportador de monocarboxilatos isoforma 3 e 4. Análise estatística: *one-way* ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

Figura 27: Expressão relativa de RNAm em relação a β -actina na região do córtex de animais da cepa WAR e Wistar tratados ou não com 2,4-Dinitrofenol (DNP) ou N-acetilcisteína (NAC). GLUT-3: transportador de glicose 3; GLUT-1: transportador de glicose 1; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK: Fosfofrutoquinase; HK: Hexokinase-1; PK: Piruvato-quinase; PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; GS: Glutamina sintetase; EAAT1: *Excitatory Amino Acid Transporter 1*; EAAT2: *Excitatory Amino Acid Transporter 2*; LDH-5: Lactato desidrogenase 5; LDH-1: Lactato desidrogenase 1; MCT-1: transportador de monocarboxilatos isoforma 1; MCT-2: transportador de monocarboxilatos isoforma 2; MCT-3/4: transportador de monocarboxilatos isoforma 3 e 4. Análise estatística: one-way ANOVA (seguido do pós-teste de Tukey); Letras semelhantes nas colunas representam diferenças significativas. Média $\pm$ erro padrão. $n = 7$.

DISCUSSÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias causadas por uma deficiência parcial ou total de uma proteína, geralmente uma enzima. A deficiência ou ausência na atividade dessa enzima pode causar bloqueio de uma rota metabólica, causando acúmulo tóxico de substâncias e/ou falta de produtos essenciais. O bloqueio metabólico pode ainda originar outras substâncias tóxicas por rotas metabólicas alternativas (SCRIVER et al., 2001; STRECK, 2003). A epilepsia associada à EIM tem geralmente características graves porque as crises se iniciam geralmente na infância e muitas vezes são resistentes aos fármacos antiepilépticos. A atividade epilética está associada a graves alterações cognitivas e/ou deterioração das funções motoras (PAPETTI et al., 2013). Epilepsia é associada à EIM de vitamina B (PLECKO; STÖCKLER, 2009), aminoácidos (WOLF et al., 2009), creatina (NASRALLAH et al., 2010), purinas (SPIEGEL et al., 2006), pirimidinas (PASCUAL et al., 2008), de mitocôndrias (FINSTERER, 2011), entre outras. As consequências são variadas, desde diminuição da visão e produção de melanina (ARMBRUST-FIGUEIREDO, 1971), acúmulo de aminoácidos no plasma (PAPETTI et al., 2013) e hiperglicemia não-cetônica (APPLEGARTH; TOONE, 2004). Como ainda não houve nenhuma investigação para verificar se WAR possuem EIM, nossos resultados são pioneiros e apontam nessa direção, visto que encontramos uma maior oxidação de aminoácidos como substrato energético, maior glicemia em jejum, menor de massa corporal e muscular em WAR. Mais do que isso, nossos principais resultados demonstram que WAR possuem diversas alterações mitocondriais, como a maior densidade mitocondrial acompanhada de alta capacidade OXPHOS, o que pode estar relacionado como causa ou consequência das alterações metabólicas encontradas nesse modelo experimental.

A atividade locomotora e exploratória em roedores pode ser utilizada como indicativo de ansiedade, verificado pela distância percorrida e número de levantamentos (ou seja, quando o roedor fica apoiado somente nas patas traseiras). Assim, animais que percorrem uma maior distância e levantam mais frequentemente durante o período de observação são considerados menos ansiosos; logo, animais mais ansiosos tendem a explorar menos o ambiente (CHOLERIS, 2001). Nossos resultados mostram que animais WAR possuem menor atividade exploratória, indicando que possuem perfil do tipo ansiogênico, corroborando com os achados de Garcia-Cairasco (GARCIA-CAIRASCO et al., 1998) obtidos por meio do teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Brevemente, o LCE é realizado em um aparato que possui dois braços abertos e dois braços fechados, sendo que efeitos do tipo ansiolíticos são demonstrados por uma maior exploração dos braços abertos, enquanto os do tipo ansiogênicos por uma maior exploração dos braços fechados (PELLOW et al., 1985). Os resultados obtidos apontaram uma menor exploração dos braços abertos do LCE realizada pelos animais WAR, sugerindo que os mesmos possuem perfil do tipo ansiogênico.

Mensurar as quantidades de O_2 consumido e CO_2 produzido gera parâmetros precisos para determinação do substrato preferencial a ser oxidado para geração de energia: valores de RQ próximos a 0.7, 0.85 ou 1.0 indicam preferência à oxidação de lipídeos, proteínas e carboidratos, respectivamente (MCCLAVE et al., 2003; ROSADO et al., 2013). Os valores de RQ (0,85), associados o aumento na excreção de ureia urinária em WAR indicam preferencial oxidação de proteínas, o que pode estar relacionado à menor massa do músculo esquelético e ao baixo índice de Lee, um indicador de deficiência no desenvolvimento. O aumento da oxidação de proteínas leva a um quadro de “restrição proteica”, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos para serem utilizados na síntese de proteínas, reduzindo assim o processo de multiplicação celular (LEE, 1929; APARECIDA DE FRANÇA et al., 2009). Esse quadro de oxidação exacerbada de aminoácidos já foi relatado em humanos diagnosticados com epilepsia e autismo (NOVARINO et al., 2012). A oxidação preferencial de proteínas também pode poupar outras reservas energéticas, o que pode estar relacionado ao maior conteúdo de glicogênio hepático e muscular em WAR. A lipólise parece similar entre WAR e Wistar, visto em condições basais ou estimuladas com isoproterenol (agonista de receptores β -adrenérgicos) em tecido adiposo epididimal (BOTION; DORETTO, 2003).

É sabido que por meio de fissão e fusão, as mitocôndrias sofrem mudanças em sua morfologia, comprimento, tamanho e número (LIU et al., 2012), uma dinâmica capaz de afetar a função mitocondrial e vice-versa (DU et al., 2009; WANG et al., 2009). Desse modo tanto a fissão quanto a fusão mitocondrial são críticas para a manutenção de populações saudáveis de mitocôndrias: enquanto a fusão mitocondrial permite a troca de conteúdo intramitocondrial entre duas ou mais organelas, reduzindo a quantidade de mitocôndrias defeituosas nas células, a fissão mitocondrial permite a eliminação de danos irreversíveis e conteúdo da organela, mantendo a integridade e homogeneidade mitocondrial das células (BOSSY-WETZEL et al., 2003). Assim a dinâmica mitocondrial é capaz de regular a eficiência da OXPHOS mitocondrial. Nossos

resultados mostraram maior concentração proteica de componentes da CTE, OXPHOS, CK, de proteínas envolvidas no processo de fusão e fissão mitocondrial no fígado de WAR. Funcionalmente, encontramos também uma elevada capacidade respiratória (nos estados *OXPHOS* e *ETS*), acoplamento (razão *L/E*) e eficiência na OXPHOS (razão *ADP/O*). Nossa hipótese é de que uma vez que é necessária alta demanda energética para contração muscular/espasmos dos membros durante as crises epiléticas, os WAR desenvolveram capacidade adaptativa ao longo das gerações (endocruzamento artificial) onde foram escolhidos indivíduos que apresentavam maior eficiência fosforilativa/densidade mitocondrial/dinâmica mitocondrial para responder ao estímulo sonoro.

In vivo, a maior capacidade OXPHOS em WAR pode ser verificada pelo teste incremental de carga, o qual mensura o potencial do metabolismo aeróbico (PILIS et al., 1993; FERREIRA et al., 2007). Tanto em condições onde as reservas de glicogênio muscular e hepática estão altas (pós-prandial) quanto baixas (jejum 15 h) a performance do WAR é melhor que a de ratos Wistar, o que reduz a chance da maior performance em WAR estar relacionada às maiores reservas de glicogênio. No entanto, não podemos excluir a hipótese de que este maior desempenho esteja associado à maior oxidação de aminoácidos, a qual segundo o “ciclo de Randle” (RANDLE et al., 1963; NELSON; COX, 2008) fornece substratos para a via gliconeogênica no fígado, que por sua vez supre o músculo esquelético com mais glicose. Outro dado que corrobora a essa hipótese, é a maior expressão de PGC1 α . O PGC-1 α foi identificado como sendo um importante regulador da gliconeogênese hepática (LIN et al., 2003). A expressão de PGC-1 α é relativamente baixa durante as condições de alimentação, e aumenta em resposta a jejum e glucagon, sugerindo um papel na gliconeogênese. Os níveis hepáticos de PGC-1 α também estão aumentados em modelos genéticos de resistência à insulina e diabetes, estados de alta produção de glicose hepática (KOO et al., 2004; BIDDINGER et al., 2008). Logo, utilizando modelos *in vivo* de superexpressão de PGC1 α foi observado que a gliconeogênese está ativa, relatada pela alta expressão de enzimas como a PCK e glicose 6-fosfatase (G-6Pase) (YOON et al., 2001; KOO et al., 2004).

De acordo com Goddard (GODDARD, 1967), *kindling* refere-se à estímulos - inicialmente elétricos - administrados repetidamente por um período determinado de tempo. Posteriormente foi relatado que estimulação repetida promove maior suscetibilidade a crise epilética (RACINE, 1972), desse modo o modelo *kindling* é

importante pois mimetiza um tipo de epilepsia parcial com envolvimento de estruturas límbicas. Contudo em animais que não apresentam suscetibilidade a epilepsia o modelo *kindling* audiogênico induz ao estresse. Segundo a OMS - Organização Mundial da Saúde - no encontro sobre ruído ocupacional em Genebra, 1995, o limite tolerável ao ouvido é de 65 dB. Ruídos acima desse valor induzem estresse e acima de 85dB pode levar ao comprometimento auditivo. Glicocorticoides são hormônios usados como indicadores de estresse (DALLA COSTA et al., 2008; KOEPPEN; STANTON, 2009), e são capazes de regular a biogênese (WEBER et al., 2002) e dinâmica mitocondriais (DU et al., 2009). Desse modo o aumento da densidade mitocondrial observado nos animais Wistar-*Kindling* no hipocampo e maior consumo de oxigênio observada em hipocampo e córtex podem ser consequências do aumento de glicocorticoides induzido pelo estresse sonoro. Anteriormente foi demonstrado que WAR apresentam uma resposta exacerbada, com maiores concentrações de corticosterona, versus ratos Wistar frente a situações de estresse devido a glândula adrenal maior (UMEOKA et al., 2011).

Radicais livres, em especial as espécies reativas de oxigênio (EROs), estão envolvidos em inúmeras condições patológicas (AHLEMEYER; KRIEGLSTEIN, 2000), inclusive da atividade epiléptica. Assim, o quadro de estresse oxidativo geralmente é visto em modelos de estudo de epilepsia, como em: 1- modelo induzido por P400, o estresse oxidativo é induzido pela redução de GSH (FREITAS, DE, 2010; LIN et al., 2010); 2- em modelo induzido por ácido caínico, é visto aumento da oxidação de proteínas e lipídeos na região do hipocampo (KIM et al., 1997); 3- em modelo induzido por pilocarpina é visto aumento da peroxidação lipídica nas regiões do hipocampo e córtex (TEJADA et al., 2006); já em modelos com sensibilidade auditiva com suscetibilidade a epilepsia como GEPRs e KMs, o estresse oxidativo é devido ao comprometimento do sistema antioxidante mediado por GPx (SHIN et al., 2008, 2011) em GERPS, e aumento na geração de EROs no CI da CTE em KMs (VENEDIKTOVA et al., 2017). De modo geral, o estresse oxidativo parece contribuir para o processo de epileptogênese, e nossos resultados mostram o quadro de estresse oxidativo em WAR.

A fim de verificar se o metabolismo mitocondrial (ATP e EROs) estão envolvidas na suscetibilidade de WAR a epilepsia, promovemos uma intervenção *in vivo* com DNP ou NAC. DNP em baixas concentrações promove um leve desacoplamento entre a CTE e a síntese de ATP na membrana mitocondrial interna e consequentemente temos: 1- redução na geração de EROs, 2- redução do dano oxidativo, 3- redução a capacidade da

OXPHOS - observado pela razão ADP/O - (CALDEIRA DA SILVA; CERQUEIRA; BARBOSA, LÍVEA F.; et al., 2008). Resultados obtidos em roedores mostram que baixas doses de DNP podem proteger neurônios e melhorar o resultado funcional em modelos animais de doenças de Alzheimer e Parkinson, epilepsia e acidente vascular cerebral isquêmico cerebral (FELICE, DE; FERREIRA, 2006a; GEISLER et al., 2016). Nossos resultados mostraram que DNP *in vivo* foi capaz de desacoplar as mitocôndrias, reduzir a produção de EROs e os danos oxidativos, contudo não foi capaz de reduzir a gravidade da crise observada pelo ISc, sugerindo que ATP e/ou EROs mitocondriais não tem papel decisivo no processo de epileptogênese em WAR.

NAC classicamente é conhecido por aumentar a concentração de GSH, consequentemente aumentando o potencial antioxidante das células (SHAHRIPOUR et al., 2014). NAC é capaz de reverter o quadro de estresse oxidativo, e em modelo induzido por PTZ aumenta o tempo de latência entre as crises exercendo um efeito anticonvulsivante dose-dependente em usos agudos e crônicos (ZAERI; EMAMGHOREISHI, 2015). Em nosso modelo, NAC foi capaz de reduzir o quadro de estresse oxidativo e ISc, sugerindo que EROs não mitocondriais apresentam papel importante para crise epilética.

Curiosamente o tratamento com NAC reduziu ansiedade – visto pela maior movimentação horizontal (CHOLERIS, 2001), e aumentou os valores de VO₂ e VCO₂, sem induzir alteração nos valores de EE. Baraldi e colaboradores (BARALDI et al., 2016) não encontraram alterações no EE após tratamento com NAC, porém Sanchez-Alavez (SANCHEZ-ALAVEZ et al., 2014), observou que NAC é capaz de prevenir a hipertermia induzida por metanfetamina, causando a redução da temperatura através da redução do EE.

Os tratamentos *in vivo* com DNP ou NAC foram capazes de reduzir o estresse oxidativo, porém apenas NAC reduziu a severidade da crise. Na busca do entendimento desses diferentes resultados, fomos investigar o metabolismo energético cerebral em WAR após os tratamentos. O metabolismo energético cerebral já foi considerado quase exclusivamente oxidativo (KETY; SCHMIDT, 1948; SOKOLOFF, 1981), porém nos últimos anos estudos demonstraram a heterogeneidade celular do cérebro, sendo que cada tipo celular apresenta um perfil metabólico distinto; enquanto astrócitos possuem alta atividade glicolítica - o que significa que produzem lactato e piruvato a partir da

glicose –, os neurônios são em sua maioria oxidativos e utilizam o lactato fornecido pelos astrócitos através dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs) (WEBER; BARROS, 2015; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015, 2018; RISKE et al., 2017). Assim, neurônios e astrócitos apresentam um acoplamento metabólico rígido. Além da função energética, o lactato modula as funções neuronais incluindo a excitabilidade, a plasticidade e a consolidação da memória (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018). Tanto em pacientes quanto em modelos experimentais foram observadas redução e redistribuição nos níveis de MCTs - redução do MCT1 e redistribuição do MCT2 - (LAURITZEN et al., 2011; LAURITZEN; PEREZ; et al., 2012; LAURITZEN; HEUSER; et al., 2012) na região epileptogênica, sugerindo uma relação entre o metabolismo energético e a crise epilética, além dos monocarboxilatos (lactato e corpos cetônicos) serem necessários para manter a função mitocondrial (BOUGH et al., 2006). Geralmente é associado prejuízo da função mitocondrial e redução da síntese de adenosina-5'-trifosfato (ATP) à epilepsia (KUHLE et al., 1980; THEODORE et al., 1983; CONNELLY et al., 1994; HETHERINGTON et al., 1995; PAN et al., 2005). Essa associação é justificada pela redução nos níveis de MCTs e consequentemente distúrbio nas concentrações de monocarboxilatos, o que pode contribuir para a epileptogênese (KUDIN et al., 2009; WALDBAUM; PATEL, 2010).

Durante a crise epilética há liberação de glutamato pelos neurônios (DURING; SPENCER, 1993) e os astrócitos respondem a essa variação de concentração aumentando a taxa de utilização de glicose do sangue ou do glicogênio armazenado (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; TSACOPOULOS; MAGISTRETTI, 1996; PELLERIN et al., 1998), com consequente aumento da concentração de lactato. Essa resposta poderia justificar o aumento nos níveis de lactato observado nos animais Wistar após o *kindling* audiogênico, e como consequência do aumento do lactato há aumento da densidade mitocondrial em neurônios como mecanismo compensatório para oxidar o lactato. Por outro lado, a justificativa para a redução nos níveis de lactato após tratamento com NAC seria devido à inibição da via glicolítica. Sabe-se que NAC é capaz de reduzir a atividade da via glicolítica através da redução do conteúdo de mRNA e proteína do GLUT4, além de reduzir o conteúdo de mRNA e a atividade da PFK e como consequência é observado redução nos valores de lactato (PINHEIRO et al., 2010; WU; WEI, 2012). Nossos resultados de RT-PCR corroboram com essa justificativa.

Além disso, como observado aqui o tratamento com DNP em WAR não reduziu de forma significativa a severidade da crise, porém induziu um leve desacoplamento mitocondrial. Dependendo do nível, o desacoplamento pode induzir aumento da via glicolítica em tecido cerebral (PEISS et al., 1951); porém dose utilizada no nosso estudo parece ser insuficiente para induzir alterações na via glicolítica, visto que é 10-100 vezes menor do que a utilizada terapeuticamente no passado, e mais de 1000 vezes menor que a dose letal para roedores (PARASCANDOLA, 1974; FELICE, DE; FERREIRA, 2006b; CALDEIRA DA SILVA; CERQUEIRA; BARBOSA, L??VEA F.; et al., 2008).

Outro dado da literatura que corrobora com a hipótese de que a bioenergética é responsável pela redução da severidade da crise são os dados relacionados a dieta cetogênica (DC). A DC é constituída por alta concentração de lipídios, baixa ou ausência de carboidratos e níveis baixos ou normais de proteínas (FREEMAN et al., 2006; HARTMAN et al., 2007). Como consequência da DC, ocorre redução de glicose como substrato energético para abastecimento cerebral, assim o cérebro produz ATP a partir quase que exclusivamente de corpos cetônicos (principalmente de acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona) (BARAÑANO; HARTMAN, 2008; MAALOUF et al., 2009), reduzindo a via glicolítica (MASINO; RHO, 2012). Como resultado da DC é observado aumento da densidade mitocondrial (BOUGH et al., 2006) além de redução nos parâmetros de estresse oxidativo e nos níveis de lactato (PAN et al., 1999; Milder; PATEL, 2012; SCHROEDER et al., 2013; ZAJAC et al., 2014; RHYU et al., 2014; GRECO et al., 2016), resultados semelhantes foram observados do WAR-NAC comparado ao WAR nesse estudo, é válido ressaltar que WAR-NAC não apresentou alteração no perfil lipídico circulante, parâmetro que normalmente é alterado pela DC (STEWART et al., 2001; NORDLI, 2002; FRASER et al., 2003).

Para estudar o efeito da modulação da bioenergética sob a crise epilética, Garriga-Canut e colaboradores (GARRIGA-CANUT et al., 2006) usaram o modelo de *kindling* elétrico, no qual uma estimulação elétrica breve e de baixa intensidade é administrada através de um eletrodo intracerebral para produzir uma breve crise focal. A aplicação repetida dessas estimulações elétricas de baixa intensidade resulta em convulsões mais longas e amplamente propagadas, observadas por intensas contrações de músculos, membros e face semelhantes às observadas em uma convulsão em humanos. Os autores

trataram os roedores com 2-desoxi-D-glucose (2DG), e observaram aumento limiar de convulsões focais evocadas por estimulação e inibiu parcialmente a gravidade progressiva da epilepsia neste modelo. A provável explicação para tais resultados seria devido a redução nos níveis de NADH. Segundo Huang & McNamara (HUANG; MCNAMARA, 2006) o NADH gerado pela glicólise desestabiliza a interação de CtBP e NRSF, permitindo a transcrição de genes alvo de NRSF tais como BDNF e TrkB e mantendo a excitabilidade neuronal normal; a administração de 2DG inibe a glicólise, reduzindo as concentrações de NADH, permitindo a formação do complexo NRSF:CtBP, reduzindo sua transcrição de genes alvo de NRSF. Menor expressão de BDNF e TrkB leva à redução da excitabilidade neuronal, aumentando o limiar convulsivo e inibindo a progressão do *kindling* (STAFSTROM et al., 2009)

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a seleção artificial realizada no processo de criação dos WAR induziu a superexpressão de mTOR e PGC1 α , e consequentemente aumento da biogênese e dinâmica mitocondriais em diversos tecidos, como fígado, musculo esquelético e cardíaco além do cérebro. A partir dos resultados obtidos com mitocôndria isoladas, podemos concluir que em WAR as mitocôndrias possuem maior capacidade fosforilativa, sem aumento na geração de EROs. Ainda utilizando mitocôndrias isoladas observamos maior enriquecimento proteico mitocondrial, como proteínas envolvidas na OXPHOS. Utilizando biopsias concluímos que WAR possuem mais proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e maior dano oxidativo devido a maior densidade mitocondrial. Como consequência da elevada densidade mitocondrial observamos maior desempenho físico em WAR. Através das observações comportamentais, concluímos que WAR apresentam perfil ansiogênico, corroborando com achados anteriores.

O *kindling* audiogênico não induz alterações na biogênese mitocondrial em WAR, provavelmente devido a elevada densidade mitocondrial encontrada em animais *naive*, desse modo mais um aumento seria inapropriado para manutenção do metabolismo celular; porém o *kindling* audiogênico induz em ratos Wistar o perfil mitocondrial encontrado em WAR, provavelmente devido ao aumento de glicocorticoides induzido pelo estresse sonoro.

A intervenção com DNP é capaz de induzir um leve desacoplamento mitocondrial no tecido cerebral e aumento da biogênese mitocondrial, porém não induz alteração na fluxo glicolítico, nem na severidade da crise audiogênica. A intervenção com NAC de modo semelhante induziu aumento da biogênese mitocondrial, redução do estresse oxidativo, além de inibir o fluxo glicolítico desse modo reduziu a severidade da crise epilética. Concluindo, em WAR a modulação da energética cerebral é capaz de modular a severidade da crise epilética, porém a modulação do estresse oxidativo não é capaz de modular de forma significativa a severidade da crise epilética.

BIBLIOGRAFIA

AAS, J.-E.; BERG-JOHNSEN, J.; HEGSTAD, E.; et al. Redistribution of Glutamate and Glutamine in Slices of Human Neocortex Exposed to Combined Hypoxia and Glucose Deprivation in vitro. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 503–515, 1993. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.1993.65>>. .

ABBACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19–29, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016622360800249X>>. .

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>>. .

AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochemistry International**, v. 36, n. 1, p. 1–5, 2000.

ALBERICI, L. C.; OLIVEIRA, H. C. F.; PATRÍCIO, P. R.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Hyperlipidemic Mice Present Enhanced Catabolism and Higher Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channel Activity. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1228–1234, 2006.

ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia social das epilepsias no Brasil**. Salvador: UFBA, Centro Editorial e Didático, 1980.

ALVAREZ-BUYLLA, R.; HUBERMAN, A.; MONTERO, S.; et al. Induction of brain glucose uptake by a factor secreted into cerebrospinal fluid. **Brain research**, v. 994, n. 1, p. 124–33, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642456>>. .

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 1981. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/290457a0>>. .

APARECIDA DE FRANÇA, S.; SANTOS, M. P. DOS; GARÓFALO, M. A. R.; et al. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1186–1192, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089990070900183X>>. .

APPLEGARTH, D. A.; TOONE, J. R. Glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinaemia): Review and update. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 27, n. 3, p. 417–422, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:BOLI.0000031222.38328.59>>. .

ARCO, A. DEL; CONTRERAS, L.; PARDO, B.; SATRUSTEGUI, J. Calcium regulation of mitochondrial carriers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 10, p. 2413–2421, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488916300775>>. .

ARMBRUST-FIGUEIREDO, J. AFECÇÕES NEUROLÓGICAS D A INFÂNCIA DETERMINADAS POR FATORES METABÓLICOS. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 29, n. 3, p. 243–282, 1971.

AULT, B.; OLNEY, M. A.; JOYNER, J. L.; et al. Pro-convulsant actions of theophylline and caffeine in the hippocampus: implications for the management of temporal lobe epilepsy. **Brain research**, v. 426, n. 1, p. 93–102, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3690322>>. .

AVOLI, M.; GLOOR, P. Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. **Experimental neurology**, v. 76, n. 1, p. 196–217, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7084360>>. .

BANDI, H.; KHAN, R.; DIBBUR, V. A returning traveller with epilepsy. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 359, p. j4664, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097384>>. .

- BARALDI, F. G.; VICENTINI, T. M.; TEODORO, B. G.; et al. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl / 6 mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 147–154, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.10.008>>. .
- BARAÑANO, K. W.; HARTMAN, A. L. The ketogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses. **Current treatment options in neurology**, v. 10, n. 6, p. 410–9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990309>>. .
- BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111004207>>. .
- BERMAN, R. F.; JARVIS, M. F.; LUPICA, C. R. Adenosine Involvement in Kindled Seizures. **Advances in Behavioral Biology**. p.423–440, 1990. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4684-5796-4_31>. .
- BIDDINGER, S. B.; HERNANDEZ-ONO, A.; RASK-MADSEN, C.; et al. Hepatic Insulin Resistance Is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Susceptibility to Atherosclerosis. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 125–134, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107003683>>. .
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. Disponível em: <<http://www.waojournal.org/content/5/1/9>>. .
- BITTAR, P. G.; CHARNAY, Y.; PELLERIN, L.; BOURAS, C.; MAGISTRETTI, P. J. Selective Distribution of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Neurons and Astrocytes of Human Brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 1079–1089, 1996. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/00004647-199611000-00001>>. .
- BLIGH; DYER. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Filtration**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BONAN, C. D.; WALZ, R.; PEREIRA, G. S.; et al. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, v. 39, n. 3, p. 229–38, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771249>>. .
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; et al. Estimates of In Vivo Insulin Action in Man: Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose Clamp Studies*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374–378, 1989. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-68-2-374>>. .
- BORGES, M. A.; BARROS, E. P. DE; ZANETTA, D. M. T.; BORGES, A. P. P. Prevalência da epilepsia entre os índios Bakairi do estado do Mato Grosso, Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 1, p. 80–85, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2002000100014&lng=pt&tlng=pt>. .
- BOSSY-WETZEL, E.; BARSOUM, M. J.; GODZIK, A.; SCHWARZENBACHER, R.; LIPTON, S. A. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 706–716, 2003.
- BOTION, L. M.; DORETTO, M. C. Changes in peripheral energy metabolism during audiogenic seizures in rats. **Physiology & behavior**, v. 78, n. 4–5, p. 535–541, 2003.
- BOUGH, K. J.; WETHERINGTON, J.; HASSEL, B.; et al. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 2, p. 223–235, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20899>>. .
- BOUZIER-SORE, A.-K.; MERLE, M.; MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. **Journal of physiology, Paris**, v. 96, n. 3–4, p. 273–82,

2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445906>>. .

BRADFORD. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Reproduction. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROWN, A. M.; RANSOM, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. **Glia**, v. 55, n. 12, p. 1263–1271, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20557>>. .

BUITRAGO BLANCO, M. M.; PRASHANT, G. N.; VESPA, P. M. Cerebral Metabolism and the Role of Glucose Control in Acute Traumatic Brain Injury. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 453–463, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1042368016300249>>. .

BUNYAN, J.; MURRELL, E. A.; SHAH, P. P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **British Journal of Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 25–39, 1976. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0007114576000718>. .

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling--an overview. **Novartis Foundation symposium**, v. 276, p. 26–48–57, 275–81, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805422>>. .

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-6497-0>>. .

BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; SATCHELL, D.; SMYTHE, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. **British journal of pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 668–88, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322041>>. .

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 102–192, 2013. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.113.008029>>. .

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Purinergic Signalling and the Nervous System**. p.119–244, 2012. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28863-0_5>. .

CALDEIRA DA SILVA, C. C.; CERQUEIRA, F. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 552–560, 2008.

CALDEIRA DA SILVA, C. C.; CERQUEIRA, F. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 552–560, 2008.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 2, p. 98–105, 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00041433-200904000-00004>>. .

CASTRO, G. P.; MEDEIROS, D. DE C.; GUARNIERI, L. DE O.; et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy & Behavior**, v. 71, p. 243–249, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505015005144>>. .

CAVALHEIRO, E. A.; CALDERAZZO FILHO, L. S.; BORTOLOTO, Z. A.; MELLO, L.; TURSKI, L. Anticonvulsant role of adenosine. **Polish journal of pharmacology and pharmacy**, v. 39, n. 5, p. 537–43, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3506733>>. .

CHIU, G. S.; FREUND, G. G. Modulation of neuroimmunity by adenosine and its receptors: Metabolism to mental illness. **Metabolism**, v. 63, n. 12, p. 1491–1498, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514002856>>. .

- CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763401000112>>. .
- CHRISTOFI, F. L.; COOK, M. A. Antagonism by theophylline of the adenosine receptor agonist 5'-N-ethykarboxamidoadenosine at the guinea pig ileum. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1195–1197, 1985. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y85-196>>. .
- CHU, N. S. Caffeine- and aminophylline-induced seizures. **Epilepsia**, v. 22, n. 1, p. 85–94, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472302>>. .
- CITRARO, R.; LEO, A.; CONSTANTIN, A.; RUSSO, E.; SARRO, G. DE. MTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis. **Pharmacological Research**, v. 107, p. 333–343, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.039>>. .
- CONNELLY, A.; JACKSON, G. D.; DUNCAN, J. S.; KING, M. D.; GADIAN, D. G. Magnetic resonance spectroscopy in temporal lobe epilepsy. **Neurology**, v. 44, n. 8, p. 1411–7, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058140>>. .
- COSTA, J. DA; OLIVEIRA, M.; PANTA, R. Epilepsia na Infância. **Acta Médica ATM**, v. 142, p. 142–79, 1982.
- CUNHA, A. O. S.; OLIVEIRA, J. A. C. DE; ALMEIDA, S. S.; GARCIA-CAIRASCO, N.; LEÃO, R. M. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. **Neuroscience**, v. 310, p. 114–127, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215008593>>. .
- CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 111–134, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11302-005-0649-1>>. .
- DAILEY, J. W.; REIGEL, C. E.; MISHRA, P. K.; JOBE, P. C. Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy research**, v. 3, n. 1, p. 3–17, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563686>>. .
- DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M. M. R.; et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, n. 3, p. 179–182, 2000.
- DALLA COSTA, O. A.; LUDKE, J. V.; RODRIGUES PARANHOS DA COSTA, J. M.; et al. Tempo de jejum na granja sobre o perfil hormonal e os parâmetros fisiológicos em suínos de abate pesados Fasting time at farm on hormonal status and physiological parameters of heavy-weight slaughter pigs. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2300–2306, 2008.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436>>. .
- DANBOLT, N. C.; FURNESS, D. N.; ZHOU, Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. **Neurochemistry International**, v. 98, p. 29–45, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018616301085>>. .
- DEITMER, J. W. Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function. **BioEssays**, v. 22, n. 8, p. 747–752, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1521-1878%28200008%2922%3A8%3C747%3A%3AAID-BIES8%3E3.0.CO%3B2-0>>. .
- DEVI, P. U.; MANOCHA, A.; VOHORA, D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 18, p. 3169–3177, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656560802568230>>. .

DHAR, S. S.; ONGWIJITWAT, S.; WONG-RILEY, M. T. T. Nuclear Respiratory Factor 1 Regulates All Ten Nuclear-encoded Subunits of Cytochrome c Oxidase in Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3120–3129, 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M707587200>>. .

DONMEZ, G.; GUARENTE, L. Aging and disease: connections to sirtuins. **Aging Cell**, v. 9, n. 2, p. 285–290, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1474-9726.2010.00548.x>>. .

DONOHUE, M. E.; ZHANG, X.; MCGINNIS, L.; et al. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 10, p. 7237–44, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490658>>. .

DORETTO, M. C.; CORTES-DE-OLIVEIRA, J. A.; ROSSETTI, F.; GARCIA-CAIRASCO, N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. **Epilepsia**, v. 50, n. 12, p. 2563–2574, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2009.02164.x>>. .

DORETTO, M. C.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PIMENTA, N. J.; SOUZA, D. A.; TATSUO, M. A. Dipyrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models. **Neuroreport**, v. 9, n. 10, p. 2415–21, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694238>>. .

DORETTO, M. C.; OLIVEIRA-E-SILVA, M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; et al. Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: Association with plasma prolactin profiles. **Epilepsy Research**, v. 54, n. 2–3, p. 109–121, 2003.

DORETTO, M. C.; SIMÕES, S.; PAIVA, A. M. R.; OSÓRIO-NETO, E. Zinc, magnesium and copper profiles in three experimental models of epilepsy. **Brain Research**, v. 956, n. 1, p. 166–172, 2002.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of physiology**, v. 68, n. 3, p. 213–37, 1929. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16994064>>. .

DU, J.; WANG, Y.; HUNTER, R.; et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3543–8, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>>. .

DUNWIDDIE, T. V.; HOFFER, B. J.; FREDHOLM, B. B. Alkylxanthines elevate hippocampal excitability. Evidence for a role of endogenous adenosine. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 316, n. 4, p. 326–30, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6267486>>. .

DUNWIDDIE, T. V.; WORTH, T. Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 220, n. 1, p. 70–6, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7053424>>. .

DURING, M. J.; SPENCER, D. D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. **Lancet (London, England)**, v. 341, n. 8861, p. 1607–10, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099987>>. .

DUTRA MORAES, M. F.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: A potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, n. 3, p. 251–259, 2000.

DZUBAY, J. A.; JAHR, C. E. The concentration of synaptically released glutamate outside of the climbing fiber-Purkinje cell synaptic cleft. **The Journal of neuroscience : the official journal of the**

Society for Neuroscience, v. 19, n. 13, p. 5265–74, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377338>>. .

EGAN, D. F.; SHACKELFORD, D. B.; MIHAYLOVA, M. M.; et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 456–461, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1196371>>. .

EIGENTLER, A.; DRAXL, A.; WIETHÜCHTER, A.; et al. Laboratory protocol: citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. **Mitochondrial Physiology Network**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/133/10/3041>>. .

ENGEL, T.; ALVES, M.; SHEEDY, C.; HENSHALL, D. C. ATPergic signalling during seizures and epilepsy. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 140–153, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390815301659>>. .

FACA, V.; CORAM, M.; PHANSTIEL, D.; et al. Quantitative Analysis of Acrylamide Labeled Serum Proteins by LC - MS / MS. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 2009–2018, 2006.

FELICE, F. DE; FERREIRA, S. Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: The gentle face of Janus. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 58, n. 4, p. 185–191, 2006a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540600702198>>. .

FELICE, F. DE; FERREIRA, S. Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: The gentle face of Janus. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 58, n. 4, p. 185–191, 2006b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540600702198>>. .

FÉRES, M. C. L. C.; CAIRASCO, N. G. Plasticidade do sistema auditivo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n. 5, p. 716–720, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992001000500018&lng=pt&tlng=pt>. .

FERNANDES, J.; SCHMIDT, M.; MONTE, T.; TOZZI, S.; SANDER, J. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre Study. **Epilepsia**, v. 33, p. 132, 1992.

FERNANDES, M. J. DA S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 85–98, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000100007&lng=pt&tlng=pt>. .

FERREIRA, J. C. B.; ROLIM, N. P. L.; BARTHOLOMEU, J. B.; et al. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE : EFFECT OF EXERCISE TRAINING. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 760–765, 2007.

FINSTERER, J. Treatment of central nervous system manifestations in mitochondrial disorders. **European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 18, n. 1, p. 28–38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500524>>. .

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.

FISHER, R. S.; EMDE BOAS, W. VAN; BLUME, W.; 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.

FRANTSEVA, M. V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; TSORAKLIDIS, G.; et al. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. **Neuroscience**, v. 97, n.

3, p. 431–435, 2000.

FRANTSEVA, M. V.; VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. **The European journal of neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1431–1439, 2000.

FRASER, D. D.; WHITING, S.; ANDREW, R. D.; et al. Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet. **Neurology**, v. 60, n. 6, p. 1026–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654976>>. .

FREEMAN, J.; VEGGIOTTI, P.; LANZI, G.; et al. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. **Epilepsy research**, v. 68, n. 2, p. 145–80, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16523530>>. .

FREITAS, R. .; NASCIMENTO, V. .; VASCONCELOS, S. M. .; et al. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 365, n. 2, p. 102–105, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394004005154>>. .

FREITAS, R. M. DE. Lipoic acid alters δ -aminolevulinic dehydratase, glutathione peroxidase and Na⁺,K⁺-ATPase activities and glutathione-reduced levels in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 3, p. 381–387, 2010.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, n. 4, p. 323–328, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462005000400013&lng=pt&tlng=pt>. .

GALVIS-ALONSO, O. Y.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A.; GARCIA-CAIRASCO, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 787–802, 2004.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; LOBO, R. . Genetic selection of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures: a quantitative analysis. **Epilepsia**, v. 31, p. 815, 1990.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; PRADO, R. P.; et al. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. **Behavioural Brain Research**, v. 48, n. 1, p. 49–56, 1992.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; NONAKA, K. O. Audiogenic and audiogenic-like seizures: Locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 3, p. 503–510, 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N.; OLIVEIRA, J. A. C.; WAKAMATSU, H.; BUENO, S. T. B.; GUIMARÃES, F. S. Reduced Exploratory Activity of Audiogenic Seizures Suceptible Wistar Rats. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 5, p. 671–674, 1998.

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 16, n. 2, p. 171–83, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6686072>>. .

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. E. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats. **Behavioural Brain Research**, v. 33, n. 1, p. 65–77, 1989. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432889800191>>. .

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. E. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 2, p. 421–427, 1991. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938491900897>>. .

GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C. Differential participation of inferior colliculus subnuclei in the NMDA-dependent audiogenic seizures elicitation. Society for Neuroscience Abstract. **Anais...** . p.909, 1992.

GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C.; DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1–2, p. 57–67, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136050>>. .

GARCIA-CAIRASCO, N.; UMEOKA, E. H. L.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. **Epilepsy & Behavior**, v. 71, p. 250–273, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505017302688>>. .

GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J. A. C.; et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research*. **Anais...** . v. 26, p.177–192, 1996.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M.; ALESSI, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). **Biochemical Journal**, v. 416, n. 3, p. 375–385, 2008. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20081668>>. .

GARRIGA-CANUT, M.; SCHOENIKE, B.; QAZI, R.; et al. 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP–dependent metabolic regulation of chromatin structure. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 1382–1387, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn1791>>. .

GEISLER, J. G.; MAROSI, K.; HALPERN, J.; MATTSO, M. P. DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. **Alzheimer's and Dementia**, v. 13, n. 5, p. 582–591, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.001>>. .

GEORGE, B.; KULKARNI, S. K. Modulation of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus by adenosinergic agents. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 19, n. 5, p. 329–33, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379781>>. .

GERHART-HINES, Z.; RODGERS, J. T.; BARE, O.; et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . **The EMBO Journal**, v. 26, n. 7, p. 1913–1923, 2007. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601633>>. .

GILLESPIE, J. H. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. **The Journal of physiology**, v. 80, n. 4, p. 345–59, 1934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16994507>>. .

GITAÍ, D. L. G.; FACHIN, A. L.; MELLO, S. S.; et al. The non-coding RNA BC1 is down-regulated in the hippocampus of Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain after audiogenic kindling. **Brain Research**, v. 1367, p. 114–121, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.069>>. .

GITAÍ, D. L. G.; MARTINELLI, H. N.; VALENTE, V.; et al. Increased expression of GluR2-flip in the hippocampus of the Wistar audiogenic rat strain after acute and kindled seizures. **Hippocampus**, p. NA-NA, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.20590>>. .

GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, p. 1020–1021, 1967.

GOMES, C. V.; KASTER, M. P.; TOMÉ, A. R.; AGOSTINHO, P. M.; CUNHA, R. A. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1380–1399, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273610004232>>. .

GORMAN, G. S.; CHINNERY, P. F.; DIMAURO, S.; et al. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16080, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201680>>. .

GRAY, M. W. Mitochondrial Evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, p. a011403–a011403, 2012. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a011403>>. .

GRECO, T.; GLENN, T. C.; HOVDA, D. A.; PRINS, M. L. Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 36, n. 9, p. 1603–1613, 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0271678X15610584>>. .

GUEDES, R. C. A.; OLIVEIRA, J. A. C. DE; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; GARCÍA-CAIRASCO, N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). **Epilepsy Research**, v. 83, n. 2–3, p. 207–214, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121108003252>>. .

GWINN, D. M.; SHACKELFORD, D. B.; EGAN, D. F.; et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727650800169X>>. .

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 251–262, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3311>>. .

HARTMAN, A. L.; GASIOR, M.; VINING, E. P. G.; ROGAWSKI, M. A. The Neuropharmacology of the Ketogenic Diet. **Pediatric Neurology**, v. 36, n. 5, p. 281–292, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899407000938>>. .

HETHERINGTON, H.; KUZNIECKY, R.; PAN, J.; et al. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopic imaging of human temporal lobe epilepsy at 4.1 T. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 3, p. 396–404, 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410380309>>. .

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HODOLIC, M.; TOPAKIAN, R.; PICHLER, R. 18F-fluorodeoxyglucose and 18F-flumazenil positron emission tomography in patients with refractory epilepsy. **Radiology and Oncology**, v. 50, n. 3, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/raon.2016.50.issue-3/raon-2016-0032/raon-2016-0032.xml>>. .

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 67–75, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223609001878>>. .

HOFFMAN, N. J.; PARKER, B. L.; CHAUDHURI, R.; et al. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 922–935, 2015.

HUANG, X.; ZHANG, H.; YANG, J.; et al. Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 193–199, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996110001865>>. .

HUANG, Y. Z.; MCNAMARA, J. O. Inhibiting glycolysis to reduce seizures: how it might work. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 1351–1352, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn1106-1351>>. .

HUO, L.; SCARPULLA, R. C. Mitochondrial DNA Instability and Peri-Implantation Lethality Associated with Targeted Disruption of Nuclear Respiratory Factor 1 in Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 2, p. 644–654, 2001. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.2.644-654.2001>>. .

- INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, n. 5, p. 577–90, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651849>>. .
- IOMMARINI, L.; GHELLI, A.; GASPARRE, G.; PORCELLI, A. M. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1858, n. 8, p. 582–590, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272817300282>>. .
- IWABU, M.; YAMAUCHI, T.; OKADA-IWABU, M.; et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1313–1319, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08991>>. .
- JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST.-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12017–12022, 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705070104>>. .
- JAMIESON, D.; CHANCE, B.; CADENAS, E.; BOVERIS, A. The Relation of Free Radical Production to Hyperoxia. **Annual Review of Physiology**, v. 48, n. 1, p. 703–719, 1986. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.48.030186.003415>>. .
- KATAGIRI, H.; TANAKA, K.; MANABE, T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. **The European journal of neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 547–553, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553304>>. .
- KELLY, D. P.; SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes & Development**, v. 18, n. 4, p. 357–368, 2004. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1177604>>. .
- KETY, S. S.; SCHMIDT, C. F. THE NITROUS OXIDE METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CEREBRAL BLOOD FLOW IN MAN: THEORY, PROCEDURE AND NORMAL VALUES 1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 27, n. 4, p. 476–483, 1948. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/101994>>. .
- KIM, H.; CHOI, D.; JHOO, W.; et al. Aspalactone, a new antiplatelet agent, attenuates the neurotoxicity induced by kainic acid in the rat. **Life Sci.**, v. 61, p. 373–381, 1997.
- KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132–141, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb2152>>. .
- KITANI, K.; KANAI, S.; IVY, G. O.; CARRILLO, M. C. Assessing the Effects of Deprenyl on Longevity and Antioxidant Defenses in Different Animal Models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1 TOWARDS PROLO, p. 291–306, 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09910.x>>. .
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne y Levy: fisiología**. 3 ed. ed. Barcelona: Elsevier Mosby, 2009.
- KOO, S.-H.; SATOH, H.; HERZIG, S.; et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3. **Nature Medicine**, v. 10, n. 5, p. 530–534, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm1044>>. .
- KRISTIÁN, T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. **Cell Calcium**, v. 36, n. 3–4, p. 221–233, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416004000600>>. .
- KRITIS, A. A.; STAMOULA, E. G.; PANISKAKI, K. A.; VAVILIS, T. D. Researching glutamate “induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 2015. Disponível em: <http://www.frontiersin.org/Cellular_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00091/abstract>. .

- KRUSHINSKY, L. V.; MOLODKINA, L. N.; FLESS, D. A.; et al. The Functional State of the Brain during Sonic Stimulation. **Physiological Effects of Noise**. p.159–183, 1970. Boston, MA: Springer US. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4684-8807-4_15>. .
- KUDIN, A. P.; ZSURKA, G.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 218, n. 2, p. 326–332, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488609000600>>. .
- KUHL, D. E.; ENGEL, J.; PHELPS, M. E.; SELIN, C. Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in humans determined by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3. **Annals of Neurology**, v. 8, n. 4, p. 348–360, 1980. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410080403>>. .
- KUMARIA, A.; TOLIAS, C. M.; BURNSTOCK, G. ATP signalling in epilepsy. **Purinergic Signalling**, v. 4, n. 4, p. 339–346, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11302-008-9115-1>>. .
- KWON, C.-H.; ZHU, X.; ZHANG, J.; et al. Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. **Nature Genetics**, v. 29, n. 4, p. 404–411, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng781>>. .
- LANE, N.; MARTIN, W. The energetics of genome complexity. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 929–934, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09486>>. .
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412003510>>. .
- LARSEN, J.; JOHANNESSEN, K. M.; EK, J.; et al. The role of SLC2A1 mutations in myoclonic astatic epilepsy and absence epilepsy, and the estimated frequency of GLUT1 deficiency syndrome. **Epilepsia**, v. 56, n. 12, p. e203–e208, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13222>>. .
- LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463–84, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701750>>. .
- LAURITZEN, F.; HEUSER, K.; LANEROLLE, N. C. DE; et al. Redistribution of monocarboxylate transporter 2 on the surface of astrocytes in the human epileptogenic hippocampus. **Glia**, v. 60, n. 7, p. 1172–1181, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22344>>. .
- LAURITZEN, F.; LANEROLLE, N. C. DE; LEE, T.-S. W.; et al. Monocarboxylate transporter 1 is deficient on microvessels in the human epileptogenic hippocampus. **Neurobiology of Disease**, v. 41, n. 2, p. 577–584, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996110003803>>. .
- LAURITZEN, F.; PEREZ, E. L.; MELILLO, E. R.; et al. Altered expression of brain monocarboxylate transporter 1 in models of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 45, n. 1, p. 165–176, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996111002555>>. .
- LEE, E. M.; PARK, G. Y.; IM, K. C.; et al. Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 5, p. 860–869, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2012.03432.x>>. .
- LEE, M. O. DETERMINATION OF THE SURFACE AREA OF THE WHITE RAT WITH ITS APPLICATION TO THE EXPRESSION OF METABOLIC RESULTS. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v. 89, n. 1, p. 24 LP-33, 1929.
- LEHMAN, J. J.; BARGER, P. M.; KOVACS, A.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 7, p. 847–856, 2000. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/10268>>. .
- LIANG, L.-P.; WALDBAUM, S.; ROWLEY, S.; et al. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: Attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. **Neurobiology of Disease**, v. 45, n. 3, p. 1068–1076, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996111004001>>. .

- LIN, J.; TARR, P. T.; YANG, R.; et al. PGC-1 β in the Regulation of Hepatic Glucose and Energy Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 30843–30848, 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M303643200>>. .
- LIN, Y.; HAN, Y.; XU, J.; et al. Mitochondrial DNA damage and the involvement of antioxidant defense and repair system in hippocampi of rats with chronic seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 947–954, 2010.
- LIU, W.; TIAN, F.; KURATA, T.; MORIMOTO, N.; ABE, K. Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 6, p. 1183–1189, 2012.
- LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 9, p. 507–513, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614711000794>>. .
- LÖSCHER, W.; FASSBENDER, C. P.; NOLTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. **Epilepsy research**, v. 8, n. 2, p. 79–94, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065646>>. .
- MAALOUF, M.; RHO, J. M.; MATTSON, M. P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 2, p. 293–315, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017308001045>>. .
- MACGREGOR, D. G.; HIGGINS, M. J.; JONES, P. A.; et al. Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 727, n. 1–2, p. 133–144, 1996.
- MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413–421, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301998000600003&lng=pt&tlng=pt>. .
- MACLEAN, B.; TOMAZELA, D. M.; SHULMAN, N.; et al. Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 966–968, 2010.
- MAGALHÃES, L. H. M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; MASSENSINI, A. R.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock. **Neuroscience Letters**, v. 369, n. 1, p. 19–23, 2004.
- MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 883–901, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315002597>>. .
- MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235–249, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn.2018.19>>. .
- MAITRE, M.; CHESIELSKI, L.; LEHMANN, A.; KEMPF, E.; MANDEL, P. Protective effect of adenosine and nicotinamide against audiogenic seizure. **Biochemical pharmacology**, v. 23, n. 20, p. 2807–16, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4154753>>. .
- MARESCAUX, C.; MICHELETTI, G.; VERGNES, M.; et al. A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, v. 25, n. 3, p. 326–31, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6426943>>. .
- MARINO JR., R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo da prevalência. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 44, n. 3, p. 243–254, 1986. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X1986000300004&lng=pt&tlng=pt>. .

- MASINO, S. A.; KAWAMURA, M.; RUSKIN, D. N.; GEIGER, J. D.; BOISON, D. Purines and neuronal excitability: Links to the ketogenic diet. **Epilepsy Research**, v. 100, n. 3, p. 229–238, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121111002178>>. .
- MASINO, S. A.; RHO, J. M. **Mechanisms of Ketogenic Diet Action**. 2012.
- MCCLAVE, S.; LOWEN, C.; KLEBER, M.; et al. Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 21–26, 2003. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/014860710302700121>>. .
- MCKENNA, M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 15, p. 3347–3358, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21444>>. .
- MCKENNA, M. C. Substrate Competition Studies Demonstrate Oxidative Metabolism of Glucose, Glutamate, Glutamine, Lactate and 3-Hydroxybutyrate in Cortical Astrocytes from Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2613–2626, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-012-0901-3>>. .
- MCKENNA, M. C.; STRIDH, M. H.; MCNAIR, L. F.; et al. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 12, p. 1561–1571, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.23908>>. .
- MCNALLY, M. A.; HARTMAN, A. L. Ketone bodies in epilepsy. **Journal of Neurochemistry**, v. 121, n. 1, p. 28–35, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x>>. .
- MEGHJI, P.; NEWBY, A. C. Sites of adenosine formation, action and inactivation in the brain. **Neurochemistry international**, v. 16, n. 3, p. 227–32, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504561>>. .
- MENG, X.-F.; YU, J.-T.; SONG, J.-H.; CHI, S.; TAN, L. Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 332, n. 1–2, p. 4–15, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X13002554>>. .
- MERGENTHALER, P.; LINDAUER, U.; DIENEL, G. A.; MEISEL, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 10, p. 587–597, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223613001306>>. .
- MEYER, H. The ninhydrin reaction and its analytical applications. **The Biochemical journal**, v. 67, n. 2, p. 333–340, 1957.
- MILDER, J.; PATEL, M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. **Epilepsy Research**, v. 100, n. 3, p. 295–303, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121111003032>>. .
- MILLS, E. L.; O'NEILL, L. A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 1, p. 13–21, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201445427>>. .
- MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144–148, 1961. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/191144a0>>. .
- MOFFATT, B. A.; ASHIHARA, H. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0018, 2002. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0018>>. .
- MUSSULINI, B. H. M. **MODULAÇÕES ENERGÉTICAS CEREBRAIS PERMITEM A MANUTENÇÃO DE CRISES EPILÉPTICAS PROLONGADAS**, 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- NASRALLAH, F.; FEKI, M.; KAABACHI, N. Creatine and Creatine Deficiency Syndromes: Biochemical and Clinical Aspects. **Pediatric Neurology**, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2009.07.015>>. .
- NEHLIG, A.; COLES, J. A. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: Is glucose used by neurons or astrocytes? **Glia**, v. 55, n. 12, p. 1238–1250, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20376>>. .
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY**. 2008.
- NICHOLLS, D. G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Letters**, v. 61, n. 2, p. 103–110, 1976. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793\(76\)2981014-9](http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793(76)2981014-9)>. .
- NICOLAIDIS, R.; BRUNO, A. N.; SARKIS, J. J. F.; SOUZA, D. O. Increase of adenine nucleotide hydrolysis in rat hippocampal slices after seizures induced by quinolinic acid. **Neurochemical research**, v. 30, n. 3, p. 385–90, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018583>>. .
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–312, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728801>>. .
- NORDLI, D. The ketogenic diet: uses and abuses. **Neurology**, v. 58, n. 12 Suppl 7, p. S21–4, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084864>>. .
- NOVARINO, G.; EL-FISHAWY, P.; KAYSERILI, H.; et al. Mutations in BCKD-kinase lead to a potentially treatable form of autism with epilepsy. **Science**, v. 338, p. 394–397, 2012.
- O'DONOHUE, N. V. **Epilepsia: história, estatística e problemas de classificação e etiologia. In: Epilepsias na Infância**. Livraria Roca, 1982.
- O'MUIRCHARTAIGH, J.; RICHARDSON, M. P. Epilepsy and the frontal lobes. **Cortex**, v. 48, n. 2, p. 144–155, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010945211002966>>. .
- ONGWIJITWAT, S.; LIANG, H. L.; GRABOYES, E. M.; WONG-RILEY, M. T. T. Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. **Gene**, v. 374, p. 39–49, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111906000412>>. .
- ORRINGER, C. E.; EUSTACE, J. C.; WUNSCH, C. D.; GARDNER, L. B. Natural History of Lactic Acidosis after Grand-Mal Seizures. **New England Journal of Medicine**, v. 297, n. 15, p. 796–799, 1977. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197710132971502>>. .
- OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondria , oxidative stress and cell death. **APOPTOSIS**, v. 12, p. 913–922, 2007.
- PAN, J. W.; BEBIN, E. M.; CHU, W. J.; HETHERINGTON, H. P. Ketosis and epilepsy: 31P spectroscopic imaging at 4.1 T. **Epilepsia**, v. 40, n. 6, p. 703–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368066>>. .
- PAN, J. W.; KIM, J. H.; COHEN-GADOL, A.; et al. Regional energetic dysfunction in hippocampal epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 111, n. 4, p. 218–224, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0404.2005.00398.x>>. .
- PANKRATOV, Y.; LALO, U.; VERKHRATSKY, A.; NORTH, R. A. Vesicular release of ATP at central synapses. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 452, n. 5, p. 589–597, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00424-006-0061-x>>. .
- PAPETTI, L.; PARISI, P.; LEUZZI, V.; et al. Metabolic epilepsy: An update. **Brain and Development**, 2013. The Japanese Society of Child Neurology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2012.11.010>>. .

- PARASCANDOLA, J. Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 5, n. 1–2, p. 69–77, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4610359>>. .
- PARPURA, V.; FISHER, E. S.; LECHLEITER, J. D.; et al. Glutamate and ATP at the Interface Between Signaling and Metabolism in Astroglia: Examples from Pathology. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 1, p. 19–34, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-016-1848-6>>. .
- PASCUAL, J. M.; CAMPISTOL, J.; GIL-NAGEL, A. Epilepsy in inherited metabolic disorders. **The neurologist**, v. 14, n. 6 Suppl 1, p. S2–S14, 2008.
- PASCUAL, J. M.; WANG, D.; LECUMBERRI, B.; et al. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. **European journal of endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 627–33, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132717>>. .
- PEISS, C. N.; FIELD, J.; HALL, V. E. Effect of 2,4-Dinitrophenol Upon Anaerobic Glycolysis in Rat Cerebral Cortex Slices. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 168, n. 1, p. 248–250, 1951. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplegacy.1951.168.1.248>>. .
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10625–9, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938003>>. .
- PELLERIN, L.; PELLEGGRI, G.; BITTAR, P. G.; et al. Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. **Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 4–5, p. 291–299, 1998. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/17324>>. .
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open "closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS**, v. 14, p. 149–167, 1985.
- PENNY, J. E.; BROWN, R. D.; HODGES, K. B.; et al. Cochlear morphology of the audiogenic-seizure susceptible (AGS) or genetically epilepsy prone rat (GEPR). **Acta oto-laryngologica**, v. 95, n. 1–2, p. 1–12, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6829289>>. .
- PEREIRA, E.; ALVES, M.; SACRAMENTO, T.; ROCHA, V. L. Dieta cetogênica : como o uso de uma dieta pode interferir em mecanismos neuropatológicos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 78–82, 2010.
- PEREIRA, F. K. S.; NEVES, M. J.; LIMA, M. P.; et al. Peripheral glucose metabolism is altered by epileptic seizures. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, n. 1, p. 105–114, 2008.
- PERKINS, R. G. A Study of the Munitions Intoxications in France. **Public Health Reports (1896-1970)**, v. 34, n. 43, p. 2335, 1919. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/4575357?origin=crossref>>. .
- PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; et al. ANAEROBIC THRESHOLD IN RATS. **COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.**, v. 106, n. 2, p. 285–289, 1993.
- PINHEIRO, C. H. DA J.; SILVEIRA, L. R.; NACHBAR, R. T.; VITZEL, K. F.; CURI, R. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 7, p. 953–960, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584910000353>>. .
- PLECKO, B.; STÖCKLER, S. Vitamin B6 dependent seizures. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 36 Suppl 2, p. S73–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19760909>>. .
- PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C. W.; et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–39, 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529258>>. .

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 269–279, 1972.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413–92, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>>. .

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7285, p. 785–9, 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13990765>>. .

RASSENDREN, F.; AUDINAT, E. Purinergic signaling in epilepsy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 9, p. 781–793, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.23770>>. .

RASTOGI, D.; NAGLE, W. A.; HENLE, K. J.; MOSS, A. J.; RASTOGI, S. P. Uncoupling of oxidative phosphorylation does not induce thermotolerance in cultured Chinese hamster cells. **International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 4, n. 3, p. 333–44, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3385224>>. .

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)>. .

RHEE, S. G.; KANG, S. W.; JEONG, W.; et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 183–189, 2005.

RHYU, H.; CHO, S.-Y.; ROH, H.-T. The effects of ketogenic diet on oxidative stress and antioxidative capacity markers of Taekwondo athletes. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 6, p. 362–366, 2014. Disponível em: <<http://e-jer.org/journal/view.php?number=2013600166>>. .

RIBEIRO DOS SANTOS, R. **Investigação neuroquímica em hipocâmpos de ratos com epilepsia audiogênica**, 2001. Universidade Federal de Minas Gerais.

RISKE, L.; THOMAS, R. K.; BAKER, G. B.; DURSUN, S. M. Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 85–89, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2045125316675579>>. .

ROMCY-PEREIRA, R. ; GARCIA-CAIRASCO, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining. **Neuroscience**, v. 119, n. 2, p. 533–546, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220300191X>>. .

ROSADO, E. L.; KAIPPET, V. C.; BRITO, R. S. DE. Energy Expenditure Measured by Indirect Calorimetry in Obesity. **Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry**, p. 309–322, 2013.

ROSS, J. M.; OBERG, J.; BRENE, S.; et al. High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 20087–20092, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1008189107>>. .

ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 24, n. 6, p. 639–53, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940439>>. .

ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M. C. A.; OLIVEIRA, J. A. C. D; GARCIA-CAIRASCO, N. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: Audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy**

Research, v. 72, n. 2–3, p. 192–208, 2006.

ROWLEY, S.; LIANG, L. P.; FULTON, R.; et al. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 75, p. 151–158, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.12.025>>. .

RUDOLPHI, K. A.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F. E.; FREDHOLM, B. B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. **Trends in pharmacological sciences**, v. 13, n. 12, p. 439–45, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1293870>>. .

RUSSELL, L. K. Cardiac-Specific Induction of the Transcriptional Coactivator Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 Promotes Mitochondrial Biogenesis and Reversible Cardiomyopathy in a Developmental Stage-Dependent Manner. **Circulation Research**, v. 94, n. 4, p. 525–533, 2004. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB>>. .

RYGIEL, K. A.; PICARD, M.; TURNBULL, D. M. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 16, p. 4499–4512, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/JP271212>>. .

SANCHEZ-ALAVEZ, M.; BORTELL, N.; GALMOZZI, A.; CONTI, B.; MARCONDES, M. C. G. Reactive oxygen species scavenger N-acetyl cysteine reduces methamphetamine-induced hyperthermia without affecting motor activity in mice. **Temperature**, v. 1, n. 3, p. 227–241, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/23328940.2014.984556>>. .

SARRO, A. DE; GRASSO, S.; ZAPPALA, M.; NAVA, F.; SARRO, G. DE. Convulsant effects of some xanthine derivatives in genetically epilepsy-prone rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 356, n. 1, p. 48–55, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228189>>. .

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417301824>>. .

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007271>>. .

SCARLATELLI-LIMA, A. V.; MAGALHÃES, L. H. M.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylentetrazole and pilocarpine. **Brain Research**, v. 960, n. 1–2, p. 184–189, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899302038313>>. .

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 7, p. 1269–1278, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488910002600>>. .

SCARPULLA, R. C.; VEGA, R. B.; KELLY, D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 459–466, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276012001075>>. .

SCHOUSBOE, A. A Tribute to Mary C. McKenna: Glutamate as Energy Substrate and Neurotransmitter—Functional Interaction Between Neurons and Astrocytes. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 1, p. 4–9, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-015-1813-9>>. .

SCHOUSBOE, A.; SCAFIDI, S.; BAK, L. K.; WAAGEPETERSEN, H. S.; MCKENNA, M. C. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. **Biomedical and Life Sciences**. p.13–30, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08894-5_2>. .

SCHROEDER, U.; HIMPE, B.; PRIES, R.; et al. Decline of Lactate in Tumor Tissue After Ketogenic Diet: In Vivo Microdialysis Study in Patients with Head and Neck Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 65,

n. 6, p. 843–849, 2013. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2013.804579>>. .

SCRIVER, C. R.; SLY, W. S.; CHILDS, B.; et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. New York, 2001.

SEALE, P.; CONROE, H. M.; ESTALL, J.; et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 96–105, 2011.

SEYMOUR, K. J.; BLUML, S.; SUTHERLING, J.; SUTHERLING, W.; ROSS, B. D. Identification of cerebral acetone by 1H-MRS in patients with epilepsy controlled by ketogenic diet. **Magma (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383091>>. .

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R.; ALEXANDROV, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 2, p. 108–122, 2014.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. ATP CONTROLLED ACETOACETATE AND CITRATE SYNTHESIS BT RAT LIVER MITOCHONDRIA OXIDISING PALMITOYL-CARNITINE, AND THE INHIBITION OF CITRATE SYNTHASE BY ATP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 22, n. 1, p. 89–93, 1966.

SHIN, E. J.; KO, K. H.; KIM, W. K.; et al. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 6, p. 1134–1147, 2008.

SHIN, E.; JEONG, J.; CHUNG, Y.; et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 2, p. 122–137, 2011. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018611001288>>. .

SIMPSON, D. P.; SHERRARD, D. J. Regulation of glutamine metabolism in vitro by bicarbonate ion and pH. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 6, p. 1088–1096, 1969. Disponível em:
<<http://www.jci.org/articles/view/106065>>. .

SOKOLOFF, L. Localization of Functional Activity in the Central Nervous System by Measurement of Glucose Utilization with Radioactive Deoxyglucose. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 7–36, 1981. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.1981.4>>. .

SPERLÁGH, B.; VIZI, S. E. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. **Seminars in Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 175–186, 1996. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044576596900238>>. .

SPIEGEL, E.; COLMAN, R.; PATTERSON, D. Adenylosuccinate lyase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 89, n. 1–2, p. 19–31, 2006. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719206001739>>. .

SRERE, P. A. [1] Citrate synthase. **Methods in Enzymology**. p.3–11, 1969. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687969130050>>. .

STAFSTROM, C. E.; OCKULY, J. C.; MURPHREE, L.; et al. Anticonvulsant and antiepileptic actions of 2-deoxy-D-glucose in epilepsy models. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 4, p. 435–447, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.21603>>. .

STAFSTROM, C. E.; ROOPRA, A.; SUTULA, T. P. Seizure suppression via glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose (2DG). **Epilepsia**, v. 49, p. 97–100, 2008. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2008.01848.x>>. .

STEINMAN, M. Q.; GAO, V.; ALBERINI, C. M. The Role of Lactate-Mediated Metabolic Coupling between Astrocytes and Neurons in Long-Term Memory Formation. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 10, 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnint.2016.00010/abstract>>. .

STEWART, W. A.; GORDON, K.; CAMFIELD, P. Acute Pancreatitis Causing Death in a Child on the Ketogenic Diet. **Journal of Child Neurology**, v. 16, n. 9, p. 682–682, 2001. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088307380101600910>>. .

STRECK, E. L. **Alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia**, 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TAMURA, R.; OHTA, H.; SATOH, Y.; et al. Neuroprotective effects of adenosine deaminase in the striatum. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 709–720, 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0271678X15625077>>. .

TEJADA, S.; ROCA, C.; SUREDA, A.; et al. Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments. **Brain Research Bulletin**, v. 69, n. 5, p. 587–592, 2006.

TENNEY, J. R.; ROZHKOV, L.; HORN, P.; MILES, L.; MILES, M. V. Cerebral glucose hypometabolism is associated with mitochondrial dysfunction in patients with intractable epilepsy and cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 55, n. 9, p. 1415–1422, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12731>>. .

TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II. Effects of nigral clobazam microinjections. **Behavioural Brain Research**, v. 52, n. 1, p. 19–28, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432805803213>>. .

TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. **Behavioural Brain Research**, v. 62, n. 1, p. 29–39, 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166432894900353>>. .

THEODORE, W. H.; KELLEY, K.; TOCZEK, M. T.; GAILLARD, W. D. Epilepsy duration, febrile seizures, and cerebral glucose metabolism. **Epilepsia**, v. 45, n. 3, p. 276–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009230>>. .

THEODORE, W. H.; NEWMARK, M. E.; SATO, S.; et al. {¹⁸F}fluorodeoxyglucose positron emission tomography in refractory complex partial seizures. **Annals of Neurology**, v. 14, n. 4, p. 429–437, 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410140406>>. .

TOKUDA, S.; MAHAFFEY, C. L.; MONKS, B.; et al. A novel Akt3 mutation associated with enhanced kinase activity and seizure susceptibility in mice. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 5, p. 988–999, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddq544>>. .

TOTOLA, L. T.; TAKAKURA, A. C.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N.; MOREIRA, T. S. Impaired central respiratory chemoreflex in an experimental genetic model of epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 3, p. 983–999, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/JP272822>>. .

TRUCCOLO, W.; DONOGHUE, J. A.; HOCHBERG, L. R.; et al. Single-neuron dynamics in human focal epilepsy. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 635–641, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2782>>. .

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 877–85, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558256>>. .

TSUTSUI, J.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. **Behavioural brain research**, v. 52, n. 1, p. 7–17, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1335263>>. .

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; COIMBRA, C.; et al. Only certain antiepileptic drugs prevent

- seizures induced by pilocarpine. **Brain research**, v. 434, n. 3, p. 281–305, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3607518>>. .
- UMEOKA, E. H. L.; GARCIA, S. B.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K.; GARCIA-CAIRASCO, N. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain Research**, v. 1381, p. 141–147, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.042>>. .
- VALVONA, C. J.; FILLMORE, H. L.; NUNN, P. B.; PILKINGTON, G. J. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. **Brain Pathology**, v. 26, n. 1, p. 3–17, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bpa.12299>>. .
- VELISEK, L.; KUBOVA, H.; POHL, M.; et al. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 346, n. 5, p. 588–91, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470230>>. .
- VENEDIKTOVA, N. I.; GORBACHEVA, O. S.; BELOSLUDTSEVA, N. V.; et al. Energetic , oxidative and ionic exchange in rat brain and liver mitochondria at experimental audiogenic epilepsy (Krushinsky – Molodkina. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 49, n. 2, p. 149–158, 2017. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10863-016-9693-5>>. .
- VIANNA, E. P. M.; FERREIRA, A. T.; DONA, F.; CAVALHEIRO, E. A.; SILVA FERNANDES, M. J. DA. Modulation of Seizures and Synaptic Plasticity by Adenosinergic Receptors in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy Induced by Pilocarpine in Rats. **Epilepsia**, v. 46, n. s5, p. 166–173, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2005.01027.x>>. .
- VIRGILIO, F. DI; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncr.2016.206>>. .
- WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 88, n. 1, p. 23–45, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121109002642>>. .
- WANG, D.; PASCUAL, J. M.; VIVO, D. DE. **Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome**. 1993.
- WANG, X.; SU, B.; ZHENG, L.; et al. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. SUPPL. 1, p. 153–159, 2009.
- WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. **Polish journal of pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 313–26, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523485>>. .
- WEBER, B.; BARROS, L. F. The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a020396, 2015. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a020396>>. .
- WEBER, K.; BRU, P.; MIKES, Z.; et al. Biogenesis Specifically in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 177–184, 2002.
- WHITELAW, B. S.; ROBINSON, M. B. Inhibitors of Glutamate Dehydrogenase Block Sodium-Dependent Glutamate Uptake in Rat Brain Membranes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00123/abstract>>. .
- WILLIAMS, R. S.; SALMONS, S.; NEWSHOLME, E. A.; KAUFMAN, R. E.; MELLOR, J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 376–380, 1986. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=3941082&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/A428EE5B-8F3B-4BBE-BA59-A760720FEC46>>. .
- WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. Physical Energy: Fuel Metabolism. **Nutrition Reviews**, v. 59, n. 1, p.

S13–S16, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2001.tb01885.x>>. .

WOLF, N. I.; GARCÍA-CAZORLA, A.; HOFFMANN, G. F. Epilepsy and inborn errors of metabolism in children. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 32, n. 5, p. 609–617, 2009.

WONG, M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition as a potential antiepileptogenic therapy: From tuberous sclerosis to common acquired epilepsies. **Epilepsia**, v. 51, n. 1, p. 27–36, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2009.02341.x>>. .

WU, S.-B.; WEI, Y.-H. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: Implication of the cell survival in mitochondrial diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 2, p. 233–247, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443911002171>>. .

XIONG, S.; MU, T.; WANG, G.; JIANG, X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. **Protein and Cell**, v. 5, n. 10, p. 737–749, 2014.

YACUBIAN, E. M. T. Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epiléticas. **Revista Neurociências**, v. 10, n. 2, p. 49–65, 2002.

YOON, J. C.; PUIGSERVER, P.; CHEN, G.; et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 131–138, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm1044>>. .

YOSHIMI, N.; FUTAMURA, T.; KAKUMOTO, K.; et al. Blood metabolomics analysis identifies abnormalities in the citric acid cycle, urea cycle, and amino acid metabolism in bipolar disorder. **BBA Clinical**, v. 5, p. 151–158, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214647416300125>>. .

YU, L.; LU, M.; JIA, D.; et al. Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. **Cancer Research**, v. 77, n. 7, p. 1564–1574, 2017. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-2074>>. .

ZAERI, S.; EMAMGHOREISHI, M. Acute and chronic effects of N-acetylcysteine on pentylenetetrazole-induced seizure and neuromuscular coordination in mice. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 118–124, 2015.

ZAJAC, A.; POPRZECKI, S.; MASZCZYK, A.; et al. The Effects of a Ketogenic Diet on Exercise Metabolism and Physical Performance in Off-Road Cyclists. **Nutrients**, v. 6, n. 7, p. 2493–2508, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/6/7/2493>>. .

ZENG, L.-H.; RENSING, N. R.; WONG, M. The Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Mediates Epileptogenesis in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 21, p. 6964–6972, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0066-09.2009>>. .

ZHANG, B.; WONG, M. Pentylenetetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. **Epilepsia**, v. 53, n. 3, p. 506–511, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2011.03384.x>>. .

ZHAO, X.; REN, X.; ZHU, R.; LUO, Z.; REN, B. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 56–70, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X16302594>>. .

ZHOU, J.; BLUNDELL, J.; OGAWA, S.; et al. Pharmacological Inhibition of mTORC1 Suppresses Anatomical, Cellular, and Behavioral Abnormalities in Neural-Specific Pten Knock-Out Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 6, p. 1773–1783, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009>>. .

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162–168, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269797923915>>. .

ZIMMER, E. R.; PARENT, M. J.; SOUZA, D. G.; et al. [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 393–395, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.4492>>. .

ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 17, n. 10, p. 420–6, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530880>>. .

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111825>>. .

ZSURKA, G.; KUNZ, W. S. Mitochondrial dysfunction and seizures: The neuronal energy crisis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 9, p. 956–966, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00148-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00148-9)>. .

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de autorização para experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 011/2015, sobre o projeto intitulado “*Caracterização do metabolismo proteico e da função contrátil e mitocondrial em músculos esqueléticos e cardíacos de WARs*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Isis do Carmo Kettelhut** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de setembro de 2015.

We certify that the protocol n° 011/2015, entitled “*Characterization of the protein metabolism and contractile and mitochondrial function in skeletal and cardiac muscle of WARs*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/28/2015.

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Anexo 2: Lista das proteínas analisadas no LC-MS/MS

Proteína	Peptídeo precursor					Íons fragmentado			
	Sequência	z	m/z	Tempo de retenção (minutes)	Localização na proteína	Número de fragmentos	Sequência	z	m/z
Proteína mitocondrial de fissão 1 (Fis1)	GIVLLELLPK	2	612,384114	24,1	54-64	4	IVLLELLPK	1	1167,465636
							VLLELLPK	1	1054,307096
							LLELLPK	1	955,175286
							LELLPK	1	842,016746
	GLLQTEPQNNQAK	2	720,875704	4,5	96-108	3	TEPQNNQAK	1	1030,075646
							EPQNNQAK	1	928,971166
							PQNNQAK	1	799,856436
Mitofusina 2	LSRPNIFILNNR	2	728,922792	17,5	248-259	3	PNIFILNNR	1	1101,285616
							IFILNNR	1	890,066446
							FILNNR	1	776,907906
	QLELLAQDYK	2	610,829703	17,1	407-416	3	LLAQDYK	1	850,983746

							LAQDYK	1	737,825206
							AQDYK	1	624,666666
Mitofusina 1	FLGSTNAQR	2	497,259248	4,2	535-543	4	LGSTNAQR	1	846,913086
							GSTNAQR	1	733,754546
							STNAQR	1	676,702926
							TNAQR	1	589,625176
	HLEEEIAR	3	332,841812	4,0	690-697	4	EEEIAR	1	746,790216
							EEIAR	1	617,675486
							EIAR	1	488,560756
							IAR	1	359,446026
<i>Optic Atrophy-1</i> (OPA-1)	NEILDEVISLSQVTPK	2	892,985649	19,25	599-614	4	ISLSQVTPK	1	973,150506
							SLSQVTPK	1	859,991966
							LSQVTPK	1	772,914216
							SQVTPK	1	659,755676
	VNDEHPAYLASDEIT	2	1015,4949	13,9	801-818	4	PAYLASDEITTVR	1	1436,594706

	TVR						AYLASDEITTVR	1	1339,478776
							YLASDEITTVR	1	1268,400426
							LASDEITTVR	1	1105,225816
Proteína de desacoplament o 1 (UCP-1)	IGLYDTVQEYFSSGR	2	867,920309	19,4	93-107	4	VQEYFSSGR	1	1073,142586
							QEYFSSGR	1	974,010776
							EYFSSGR	1	845,880806
							FSSGR	1	553,591466
proteína de desacoplament o 2 (UCP-2)	LLAGSTTGALAVAV AQPTDVVK	2	1041,593886	17,3	120-141	4	LAVAVAQPTDVVK	1	1311,554946
							AVAVAQPTDVVK	1	1198,396406
							VAVAQPTDVVK	1	1127,318056
							PTDVVK	1	658,767766
proteína de desacoplament o 3 (UCP-3)	SPYSGLVAGLHR	2	628,840936	15,3	73-84	4	YSGLVAGLHR	1	1073,232156
							GLVAGLHR	1	822,979796
							LVAGLHR	1	765,928176

							VAGLHR	1	652,769636
	GTYSGLVAGLHR	2	521,767437	3,4	107-116	4	GLVAGLHR	1	884,961516
							LVAGLHR	1	769,873516
							VAGLHR	1	632,733336
							AGLHR	1	545,655586
Subunidade beta, ATP sintase (ATP5B)	VVDLLAPYAK	2	544,821149	13,7	189-198	4	LLAPYAK	1	775,960056
							LAPYAK	1	662,801516
							APYAK	1	549,642976
							PYAK	1	478,564626
	IGLFGGAGVGK	2	488,284734	11,8	202-212	3	LFGGAGVGK	1	805,946126
							FGGAGVGK	1	692,787586
							GGAGVGK	1	545,612376
	AIAELGIYPAVDPLD STSR	2	994,520387	18,1	388-406	3	YPAVDPLDSTSR	1	1321,420286
							PAVDPLDSTSR	1	1158,245676
							PLDSTSR	1	775,831586

ATPase transportadora de sódio / potássio, proteína de tipo alpa (ATP1A)	AVDSLVPIGR	2	513,800748	10,55	195-204	3	SLVPIGR	1	741,903326
							VPIGR	1	541,667036
							PIGR	1	442,535226
Malato desidrogenase	VAVLGASGGIGQPLS LLLK	2	897,048386	22,95	27-45	3	IGQPLSLLLK	1	1082,363706
							GQPLSLLLK	1	969,205166
							PLSLLLK	1	784,023576
	ANIGQPLSLLLK	2	496,774199	9,20	177-185	3	IGQPLSLLLK	1	807,958856
							GQPLSLLLK	1	706,854376
							SLLLK	1	559,679166
Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 1 (VDAC1)	LTLSALLDGK	2	515,810782	16,8	257-266	3	LSALLDGK	1	816,967076
							SALLDGK	1	703,808536
							LLDGK	1	545,652436
Proteína de	GFGFGLVK	2	412,736888	14,1	33-40	3	GFGFGLVK	1	620,764536

canal seletivo aniônico dependente da tensão 2 (VDAC2)	YQLDPTASISAK	2	647,337892	8,6	237-248	3	FGLVK	1	563,712916
							GLVK	1	416,537706
							DPTASISAK	1	889,974886
							PTASISAK	1	774,886886
							TASISAK	1	677,770956
Proteína de canal seletivo aniônico dependente da tensão 3 (VDAC3)	VCNYGLIFTQK	2	671,84483	13,05	64-74	4	NYGLIFTQK	1	1084,251946
							YGLIFTQK	1	970,148706
							GLIFTQK	1	806,974096
							LIFTQK	1	749,922476
Subunidade de receptor de importação mitocondrial TOM20 (TOM20)	FFLEEIQLGEELLAQGDYEK	2	1186,088831	26,51	69-88	5	EELLAQGDYEK	1	1295,379556
							LLAQGDYEK	1	1037,150096
							LAQGDYEK	1	923,991556
							AQGDYEK	1	810,833016
							QGDYEK	1	739,754666
Quinona	LSPDIVAEQK	2	550,303321	9,85	81-90	4	PDIVAEQK	1	900,013066

oxidoreductase 1 (NQO1)							DIVAEQK	1	802,897136
							IVAEQK	1	687,809136
							VAEQK	1	574,650596
Quinona oxidoreductase 2 (NQO2)	NDVTGALSNPEVFK	2	745,877913	17,9	54-67	4	TGALSNPEVFK	1	1163,307396
							ALSNPEVFK	1	1005,151296
							LSNPEVFK	1	934,072946
							PEVFK	1	619,733416
α -Tubulina	AVFVDLEPTVIDEVR	2	851,970081	18,66	64-78	4	DLEPTVIDEVR	1	1285,663422
							LEPTVIDEVR	1	1170,636479
							EPTVIDEVR	1	1057,552415
							PTVIDEVR	1	928,509822
	EIIDLVLDR	2	543,636556	16,76	112-120	3	IDLVLDR	1	843,493444
							DLVLDR	1	730,40938
							LVLDR	1	615,382437
Transaminase	QEVLAELAAK	2	536,623191	10,40	379-388	4	EVLAELAAK	1	943,545873

glutâmica pirúvica (GPT)							VLAELAAK	1	814,50328
							LAELAAK	1	715,434866
							AELAAK	1	602,350802
	LTEQVFNEAPGIR	2	737,826781	11,1	391-403	4	VFNEAPGIR	1	1002,536706
							FNEAPGIR	1	903,468292
							NEAPGIR	1	756,399878
							PGIR	1	442,277243
Glicerol-3- fosfato desidrogenase 1 (GPD1)	ANTIGISLIK	2	515,626306	12,95	110-119	3	TIGISLIK	1	844,55023
							IGISLIK	1	743,502552
							GISLIK	1	630,418488
	FCETTIGCK	2	558,651006	4,20	160-168	4	CETTIGCK	1	968,417579
							ETTIGCK	1	808,38693
							TTIGCK	1	679,344337
							TIGCK	1	578,296659
Piruvato	FIGPSPEVVR	2	551,144871	9,35	137-146	4	GPSPEVVR	1	840,457393

carboxilase (PC)							PSPEVVR	1	783,435929
							SPEVVR	1	686,383165
							PEVVR	1	599,351137
	GTPLDTEVPLER	2	664,237601	10,60	818-829	4	DTEVPLER	1	958,484001
							TEVPLER	1	843,457058
							EVPLER	1	742,40938
							PLER	1	514,298373
	IAEEFEVELER	2	682,746256	12,8	1043-1053	4	EEFEVELER	1	1179,552809
							EFEVELER	1	1050,510216
							FEVELER	1	921,467623
							EVELER	1	774,399209
Fosfoenol piruvato carboxikinase 1 (PCK1)	CLHSVGCPPLK	3	461,236356	13,7	191-202	4	GCPLPLK	1	784,438572
							CPLPLK	1	727,417108
							PLPLK	1	567,38646
							LPLK	1	470,333696

	GLGDVNVEELFGISK	2	789,385386	20,9	567-581	4	NVEELFGISK	1	1135,599366
							VEELFGISK	1	1021,556438
							EELFGISK	1	922,488024
							ELFGISK	1	793,445431
Fructose-1,6-Bisfosfato 1 (FBP1)	GNIYSINEGYAK	2	665,224931	8,0	206-217	4	YSINEGYAK	1	1044,499651
							SINEGYAK	1	881,436323
							INEGYAK	1	794,404294
							NEGYAK	1	681,32023
	TLVYGGIFLYPANK	2	778,920056	18,3	255-268	4	YGGIFLYPANK	1	1242,651735
							GGIFLYPANK	1	1079,588407
							IFLYPANK	1	965,545479
							FLYPANK	1	852,461415
Glutamato Oxalacetato Transaminase 2 (GOT2)	FVTVQTISGTGALR	2	725,837536	12,2	125-138	4	TVQTISGTGALR	1	1203,669176
							QTISGTGALR	1	1003,553084
							TISGTGALR	1	875,494506

							ISGTGALR	1	774,446828
	VGASFLQR	2	439,509831	7,6	139-146	4	GASFLQR	1	778,420613
							ASFLQR	1	721,399149
							SFLQR	1	650,362036
							FLQR	1	563,330007
	VGAFTVVCK	2	491,101536	8,1	287-295	4	GAVTVVCK	1	881,45495
							AFTVVCK	1	824,433486
							FTVVCK	1	753,396373
							TVVCK	1	606,327959
Glutamato Oxalacetato Transaminase 1 (GOT1)	VGGVQSLGGTGALR	2	636,722881	7,8	100-113	5	GVQSLGGTGALR	1	1115,616747
							VQSLGGTGALR	1	1058,595283
							QSLGGTGALR	1	959,526869
							SLGGTGALR	1	831,468292
							LGGTGALR	1	744,436263
	IVATTLSNPELFK	2	717,342306	13,7	305-317	4	LSNPELFK	1	947,519659

							SNPELFK	1	834,435595
							NPELFK	1	747,403566
							PELFK	1	633,360639
Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR)	YCVLASLDER	2	613,696856	12,2	672-681	4	CVLASLDER	1	1062,524821
							VLASLDER	1	902,494172
							LASLDER	1	803,425758
							SLDER	1	619,30458
	VLGLLGALDPYK	2	630,264556	11,7	886-897	4	GALDPYK	1	763,398481
							ALDPYK	1	706,377017
							LDPYK	1	635,339903
							PYK	1	407,228896

Anexo 3: Símbolo dos aminoácidos utilizados para ilustrar a sequência de aminoácidos do peptídeo precursor e íons fragmentado do anexo 2.

Código (Letra)	Aminoácido
A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Aspartato
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido glutâmico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptofano
Y	Tirosina
V	Valina