

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF TUISKON DICK
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**PERFIL ELETROENCEFALOGRÁFICO E DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO
E GABA ASSOCIADOS À EPILEPTOGÊNESE EM MODELO DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA TIPO I**

Mayara Vendramin Pasquetti

Dissertação de Mestrado
apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF TUISKON DICK
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**PERFIL ELETROENCEFALOGRÁFICO E DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO
E GABA ASSOCIADOS À EPILEPTOGÊNESE EM MODELO DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA TIPO I**

Mayara Vendramin Pasquetti

Orientadora: Maria Elisa Calcagnotto

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre.

Banca examinadora
Prof. Dr. Guilhian Leipnitz (UFRGS)
Prof Dr. Jorge Alberto Quillfeldt (UFRGS)
Prof^a Dra Vera Maria Treis Trindade (UFRGS)

Porto Alegre, fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Maria Elisa Calcagnotto, por estar sempre presente e ser fonte constante de inspiração. Obrigada pela paciência, pelo imenso conhecimento, pela experiência, sabedoria e amizade. Por ter me apresentado e me ensinado a amar a eletrofisiologia.

Aos professores Moacir Wajner e Diogo Onofre Gomes de Souza, pela orientação e sábios conselhos.

Aos professores Guilhian Leipnitz, Jorge Quillfeldt e Vera Maria Treis Trindade, por terem aceitado comporem a banca avaliadora deste trabalho.

Ao Alexandre Amaral e à Bianca Seminoti, por terem sido fundamentais no fornecimento dos animais e em pontos chave para os objetivos do projeto.

Ao Marcelo Ganzella e a Samanta, por toda a parte bioquímica deste trabalho, pelas análises e pelas ótimas ideias.

À Querusche pela amizade, as ideias (sempre muito viáveis), o companheirismo e ajuda no MATLAB. E pelas estrelinhas também.

Ao Eduardo, por estar do meu lado numa das fases mais complicadas que passei até hoje, e por emprestar a casa e o computador pra que boa parte dessa dissertação fosse escrita.

Aos meus amigos, de perto e de longe, pelo companheirismo, pelas risadas, pelas ideias, pela força e motivação, por serem essenciais na minha felicidade.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, paciência e educação, que foram fundamentais pra que eu me tornasse quem sou hoje.

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto
É realidade”
Raul Seixas*

Muito obrigada por tudo!

RESUMO

Acidemia glutárica tipo I (AGI) é uma doença metabólica hereditária causada pela mutação no gene que codifica a enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH). Os principais sintomas aparecem entre os 6 meses e 3 anos de idade e são caracterizados por distonia progressiva, discinesia déficit neurológico, macrocefalia e crises epiléticas recorrentes. Um importante modelo experimental que apresenta características e fenótipo bioquímico muito semelhantes a AGI em humanos é o de camundongos nocaute para a enzima GCDH submetidos à dieta com sobrecarga de lisina (*Gcdh*^{-/-}-Lis). Estudos têm mostrado um desequilíbrio de neurotransmissão excitatória e inibitória no SNC, diminuição da recaptação de glutamato, diminuição da atividade da bomba Na⁺K⁺-ATPase, e inibição da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) em modelos animais e em pacientes com AGI. Estas alterações parecem ser causadas pelo acúmulo dos ácidos glutárico, 3-OH-glutárico e glutacônico nos tecidos e fluidos corporais. Neste trabalho avaliamos o desenvolvimento de crises epiléticas espontâneas ou induzidas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis e a possível associação com mudanças no padrão de liberação de glutamato e GABA no córtex cerebral. Para tanto, analisamos primeiramente o padrão de oscilações cerebrais e a presença de crises epiléticas espontâneas e induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) através de técnicas eletrofisiológicas *in vivo* (vídeo-EEG). Posteriormente avaliamos em sinaptossomas corticais a liberação de glutamato e GABA por HPLC e o imunoconteúdo de vGLUT1, vGAT e GAD utilizando *Western blot*. A abordagem experimental foi igualmente realizada em animais *Gcdh*^{-/-} com dieta normal e animais *Gcdh*^{+/+} com e sem sobrecarga de lisina (controle). Nossos resultados mostram que 72% dos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis (13/18) apresentaram crises epiléticas espontâneas, sem nenhuma manifestação nos animais dos grupos *Gcdh*^{-/-} (n= 18) ou controle (n=17). Além disso, houve um aumento da severidade das crises epiléticas induzidas com PTZ nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis quando comparados aos grupos *Gcdh*^{-/-} e controle. Análise espectral do EEG evidenciou uma diminuição significativa das oscilações teta e gama com predomínio de ondas lentas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis (n=9) quando comparados aos grupos *Gcdh*^{-/-} (n=5) e controle (n=15). A liberação de glutamato e GABA basais e após despolarização nas preparações de sinaptossoma cortical nos grupos *Gcdh*^{-/-} e *Gcdh*^{-/-}-Lis foi significativamente menor quando comparada com o grupo controle (p<0,05). Porém, a porcentagem de glutamato liberado após despolarização em relação ao basal aumentou significativamente no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis quando comparado com demais grupos (p<0,05) sem um aumento na porcentagem de liberação de GABA pós-despolarização. Esta diminuição na liberação de GABA foi associada a uma diminuição do imunoconteúdo de GAD em sinaptossomas corticais do grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis. Entretanto o imunoconteúdo dos transportados vesiculares de glutamato (vGLUT1) e GABA (vGAT) foram semelhantes em todos os grupos. Nossos resultados mostram uma hiperexcitabilidade neuronal nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis que pode, pelo menos em parte, estar relacionada com a diminuição nos níveis corticais de GABA pela diminuição da enzima GAD e pelo aumento da liberação de glutamato em relação ao GABA em situações de despolarização neuronal. Observamos também uma mudança no perfil de oscilações corticais que pode estar associada às alterações neurológicas e epileptogênese em AGI. Mecanismos eletrofisiológicos e moleculares envolvidos na epileptogênese dos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis estão em andamento.

ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GAI) is an inherited metabolic caused by mutations in the gene encoding glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). Symptoms appear from 6 months to 3 years of age and are characterized by progressive dystonia, dyskinesia, neurological deficit, macrocephaly and recurrent seizures. An important experimental model with features and biochemical phenotype very similar to GAI in humans is the GCDH knockout mice under lysine overload special diet (*Gcdh*^{-/-}-*Lis*). Studies have shown an imbalance of excitatory and inhibitory neurotransmission in CNS, decreased reuptake of glutamate, and Na + K + ATPase pump activity and glutamic acid decarboxylase (*GAD*) inhibition in animal models and patients with GAI. These changes appear to be attributed to the increase of glutaric, 3-OH-glutaric and glutaconic acids in tissues and body fluids. In this work, we evaluated the development of spontaneous or induced seizures in *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice and the possible association with changes in glutamate and GABA release pattern in the cerebral cortex. Therefore, firstly we analyze the brain oscillation profile and the presence of spontaneous epileptic seizures and pentylenetetrazol (PTZ) - induced seizures using *in vivo* electrophysiology (video - EEG). Subsequently, we evaluated, in cortical synaptosomes, the glutamate and GABA release by HPLC and the VGLUT1, vGAT and GAD immunocontents using Western blot. The same experimental approach was conducted in *Gcdh*^{-/-} mice under normal diet and *Gcdh*^{+/+} mice under either normal diet or under lysine overload (control). Our results show that 72 % of *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice (13/18) had spontaneous seizures, while no seizures were observed in *Gcdh*^{-/-}(n = 18) and control (n = 17) groups. In addition there was an increase in severity of PTZ-induced seizures in *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice when compared to *Gcdh*^{-/-} and control groups. EEG spectral analysis showed a significant decrease in theta and gamma oscillations with a predominance of slow waves in *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice (n = 9) when compared to *Gcdh*^{-/-} (n = 5) and control (n = 15) groups. The release of glutamate and GABA before and after depolarization was significantly lower in cortical synaptosome preparations from *Gcdh*^{-/-} and *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice when compared with control group (p<0.05). However, the percentage of glutamate released after depolarization increased significantly in *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice when compared with other groups (p<0.05), with no increase in percentage of GABA release post-depolarization. This reduction in GABA release was associated with a decreased immunocontent of GAD in cortical synaptosomes from *Gcdh*^{-/-}-*Lis*. However, the immunocontent of vesicular glutamate and GABA transporter (VGLUT1 and vGAT) were similar in all groups. Our results show that *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice exhibited neuronal hyperexcitability that can be, at least in part, related to reduced levels of GABA in cerebral cortex induced by decreased in the GAD immunocontent and the increased glutamate release during neuronal depolarization. We also observed a change in the cortical oscillation profile that can be associated with neurological abnormalities and epileptogenesis in AGI. Electrophysiological and molecular mechanisms underlying epileptogenesis in *Gcdh*^{-/-}-*Lis* mice are under investigation.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-OHGA - 3-hidróxi-glutárico

AG - ácido glutárico

AGI – acidemia glutárica tipo I

CEPS - correntes excitatórias pós-sinápticas

CG/MS - cromatografia gasosa com espectrometria de massa

CIOMS - Council for International Organizations of Medical Sciences

CIPS - correntes inibitórias pós-sinápticas

CoA – coenzima A

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EEG - eletroencefalograma

FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

GABA - ácido gama-aminobutírico

GAD - glutamato descarboxilase ou descarboxilase do ácido glutâmico

GCDH - glutaril-CoA desidrogenase

HBSS – solução salina balanceada de Hanks

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

IBRO - International Brain Research Organization

ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IgG – imunoglobulina G

Lis - lisina

Na⁺, K⁺-ATPase – sódio/potássio ATPase

PTZ - pentilenotetrazol

SBCAL/COBEA - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SDS – dodecil sulfato de sódio

SNC – sistema nervoso central

TBS – tampão Tris salina

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

Trizma - 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

T-TBS - TBS + polisorbato 20

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

vGAT – transportador vesicular de GABA

vGLUT – transportador vesicular de glutamato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano.

Figura 2 – Somente animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentam crises epilépticas espontâneas e recorrentes (CER).

Figura 3 – Animais *Gcdh*^{-/-} apresentam diminuição nas oscilações teta e gama predominando as oscilações lentas (delta) após a dieta com sobrecarga de lisina

Figura 4 – Predominância de oscilações lentas em animais *Gcdh*^{-/-}-Lis.

Figura 5 - Animais controle não apresentam alterações no padrão de oscilações cerebrais.

Figura 6 – Animais *Gcdh*^{-/-}-Lis exibem aumento da suscetibilidade a crises epilépticas induzidas por PTZ (60mg/Kg i-p).

Figura 7 – Crise epiléptica estágio V induzida por PTZ (60mg/kg, i-p).

Figura 8 – Análise por HPLC mostra mudança na quantidade de liberação de glutamato e GABA em sinaptossoma cortical.

Figura 9 – Diminuição da glutamato descarboxilase em sinaptossomas corticais quantificados por *Western blot*.

Figura P1 – Análise por HPLC mostra mudança na quantidade de liberação de glutamato e GABA em sinaptossoma estriatal.

Figura P2 – Diminuição do transportado vesicular de glutamato em sinaptossomas estriatais quantificados por *Western blot*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos valores de P das frequências delta, teta e gama nos diferentes grupos de animais. Note que somente no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis ocorre diminuição significativa das frequências teta e gama (*Qui-quadrado*, **p*<0,05).

Tabela 2 – Caracterização das crises epiléticas induzidas por PTZ nos diferentes grupos de animais.

Tabela 3 – Liberação de glutamato e GABA em sinaptossomas corticais dos diversos grupos de animais.

Tabela P1 – Liberação de glutamato e GABA em sinaptossomas estriatais dos diversos grupos de animais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	1
1.2 Acidemias Orgânicas	2
1.2.1 Acidemia Glutárica Tipo I	3
1.2.2 O modelo para AGI	6
1.3 Epileptogênese	7
1. 4 Hipótese	8
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos Gerais	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Animais	10
3.2 Eletrofisiologia <i>in vivo</i>	11
3.2.1 Implantação dos eletrodos	12
3.2.2 Registros eletrofisiológicos <i>in vivo</i>	13
3.3 Preparação dos sinaptossomas	13
3.4 Liberação de glutamato e GABA por despolarização com alta concentração de potássio em sinaptossomas.....	14
3.4.1. Quantificação de glutamato e GABA por HPLC.....	14
3.5 <i>Western blot</i>	15
3.6 Análise dos Dados	16
4.RESULTADOS	17

4.1 Animais <i>Gcdh</i> ^{-/-} submetidos à dieta com sobrecarga de lisina apresentam crises epilépticas espontâneas	17
4.2 Ocorre diminuição das oscilações teta e gama nos animais <i>Gcdh</i> ^{-/-} submetidos à dieta com sobrecarga de lisina	19
4.3 Aumento da severidade das crises epilépticas induzidas por PTZ nos animais <i>Gcdh</i> ^{-/-} submetidos à dieta com sobrecarga de lisina	23
4.4 Análise por HPLC mostra mudanças no padrão de liberação de glutamato e GABA em sinaptossomas de córtex dos animais nocaute para GCDH	26
4.5 Investigação por <i>Western blott</i> mostra uma diminuição do imunocnteuodo da glutamato descarboxilase no córtex dos animais <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Lis.....	29
5.DISSUSSÃO	31
5.1 Hiperexcitabilidade e mudança no perfil dos ritmos cerebrais	31
5.2 Déficit na liberação de glutamato e GABA a nível cortical	33
6.CONCLUSÃO	36
7.PERSPECTIVAS	36
8.RESULTADOS PRELIMINARES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO 1	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo “erros inatos do metabolismo” foi cunhado pelo médico inglês, Sir Archibald Edward Garrod para designar doenças como a alcaptonúria e a cistinúria. Unindo seus conhecimentos prévios que consideravam a química da urina como um “reflexo do metabolismo sistêmico e das doenças” com observações de famílias afetadas com uma obscura doença (alcaptonúria, considerada obscura pela coloração negra da urina) e aplicando os conceitos já conhecidos da herança Mendeliana, Garrod foi capaz de descrever um padrão autossômico recessivo da doença. Ao observar que a cor da urina era ocasionada por grandes concentrações de ácido homogentísico, um metabólito normal da degradação protéica, Garrod propôs que alguma enzima da rota de degradação de compostos chamados alcaptanos estaria comprometida. Seus achados foram publicados em 1902 sob o título “*The Incidence of Alkaptonuria: a Study in Chemical Individuality*” (A Incidência da Alcaptonúria: um Estudo em Individualidade Química) no periódico “The Lancet”, hoje pertencente à editora holandesa Elsevier. Foram necessários cerca de 50 anos de pesquisas posteriores até o conhecimento de todos os passos descritos por Garrod (GARROD, 1902).

Com a descoberta de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas envolvendo o acúmulo de substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultam da síntese, enzimática ou não, qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína pertencente ao metabolismo (SCRIVER *et al.*, 2001). Tal bloqueio metabólico pode ocasionar o acúmulo de

precursores e/ou intermediários das reações envolvidas, acarretando na compensação por rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo.

O livro “*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*” (Bases Metabólicas e Moleculares das Doenças Hereditárias), que tradicionalmente coleta o conhecimento atual no campo, na sua 8ª edição, publicada em 2001, contém dados de mais de 500 erros inatos do metabolismo. Embora individualmente raras, como existem muitos tipos de doenças metabólicas hereditárias, elas afetam de 1-2% de todos os recém-nascidos vivos (BARIĆ *et al.*, 2001)

1.2 ACIDEMIAS ORGÂNICAS

O termo “acidemia orgânica” ou “acidúria orgânica” se aplica a um grupo de doenças caracterizadas pela excreção de ácidos orgânicos não-aminos na urina. A maioria resulta da disfunção de um passo específico do catabolismo de aminoácidos, usualmente a deficiência de uma enzima específica. São causadas em sua maioria por um catabolismo anormal de aminoácidos de cadeia ramificada ou da lisina (SEASHORE, 2001).

Acidemias orgânicas são consideradas as mais frequentes doenças metabólicas hereditárias entre as crianças gravemente doentes e, juntamente com aminoacidopatias constituem os grupos mais prevalentes de erros inatos do metabolismo em populações de alto risco (WAJNER *et al*, 2001).

As manifestações clínicas predominantes incluem disfunção neurológica, em suas mais diversas formas de expressão, como regressão neurológica, crises epiléticas, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos

coreatetóticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental e outras manifestações (SCRIVER *et al*, 2001).

Os resultados laboratoriais que sugerem uma acidemia orgânica incluem acidose, cetose, hiperamonemia, testes de função hepática anormais, hipoglicemia e neutropenia. A primeira linha do diagnóstico consiste na análise de ácidos orgânicos na urina por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS). Testes confirmatórios envolvem ensaios de atividade da enzima deficiente em linfócitos ou cultura de fibroblastos e/ou testes genéticos moleculares (SEASHORE, 2001).

As acidemias orgânicas mais comuns são as acidemias (acidúrias) propiônica (deficiência de propionil-CoA carboxilase), metilmalônica (deficiência de metilmalonil-CoA mutase, uma enzima dependente de vitamina B12), e isovalérica (deficiência de isovaleril-CoA desidrogenase) e em particular a acidúria glutárica tipo I (deficiência de glutaril-CoA desidrogenase - AGI). (DIONISI-VICI *et al*, 2006; LINDNER *et al*, 2004).

1.2.1 Acidemia Glutárica Tipo I

Acidemia glutárica tipo I (AGI) é uma doença neurometabólica autossômica recessiva do metabolismo de aminoácidos causada pela deficiência na atividade da enzima da matriz mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), devido a mutações no gene *GCDH* localizado no cromossomo 19p13.2. Esta enzima catalisa a descarboxilação oxidativa do glutaril-CoA, um intermediário do catabolismo dos aminoácidos triptofano, lisina e hidroxilisina (KOELLER *et al*, 2001; JAFARI *et al*, 2011; TORTORELLI *et al*, 2005). A reação ocorre em duas etapas: a desidrogenação do glutaril-CoA formando glutaconil-CoA, seguida pela

descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA e CO₂ (HÄRTEL *et al*, 1993) (Figura 1). Em indivíduos com AGI tanto a desidrogenação de glutaril-CoA como a descarboxilação de crotonil-CoA estão bloqueadas (CHRISTENSEN *et al*, 1993; LIESERT *et al*, 1999). Este bloqueio causa o acúmulo dos ácidos glutárico (AG), 3-hidroxiglutarico (3-OHGA) e glutacônico, glutaril-CoA e conjugados da carnitina em tecidos e líquidos corporais (GOODMAN *et al*, 1977; BARIC *et al*, 1998). Mais de 70 mutações foram identificadas, sendo a R402W a mais frequente, e havendo alterações na porcentagem de atividade da enzima dependendo do tipo de mutação (KÖLKER *et al*, 2006).

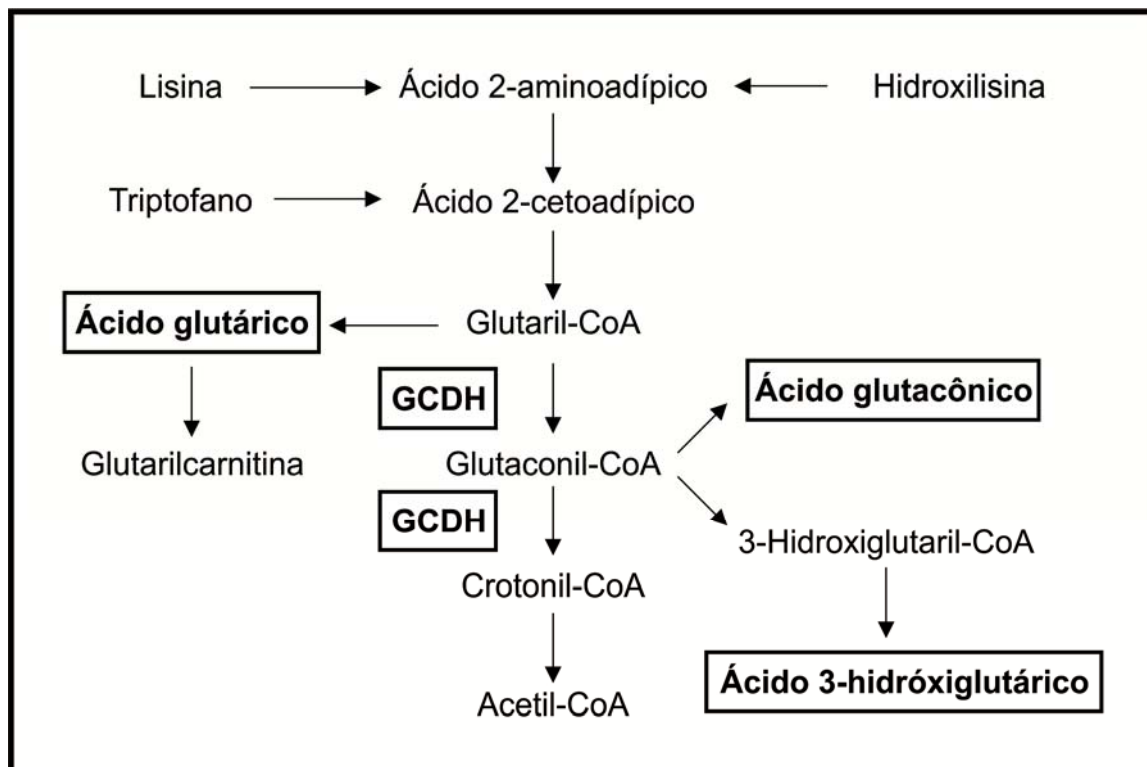


Figura 1 – Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano.

AGI foi descrita pela primeira vez em 1975 (GOODMAN *et al*, 1975) e tem uma prevalência estimada de 1:30:000 a 1:100.000 recém nascidos (HOFFMAN, 1994; JAFARI, 2011), podendo chegar a 1:3000 em algumas comunidades (BIERY

et al, 1996; HAWORTH *et al.*, 1991; GREENBERG *et al.*, 1995). A primeira evidência clínica é a macrocefalia (HOFFMAN *et al*, 1995) e se não tratada a doença progride para encefalopatia aguda, com degeneração estriatal (caudado e putâmen), distonia progressiva, discinesia, crises epiléticas e déficit do crescimento e do desenvolvimento neurológico. Em geral os sintomas aparecem nos primeiros 24 meses de vida, indicando uma vulnerabilidade restrita a um período do desenvolvimento neurológico. Não tratados, cerca de 90% dos pacientes irá desenvolver dano neurológico durante um período finito do desenvolvimento (entre 6 e 36 meses de vida) devido à episódios agudos de encefalopatia (HOFFMAN *et al*, 1996; STRAUSS *et al.*, 2003; KYLLERMANN *et al*, 2004). Exames complementares mostram níveis elevados de ácido glutárico, 3-OH-glutárico e glutacônico na urina e no sangue, atrofia fronto-temporal bilateral e/ou lesões nos gânglios da base observados em exames de neuroimagem (AMIR, 1989; JAMJOOM *et al*, 1995). Alguns pacientes podem ser assintomáticos, ou apresentar crises epiléticas e macrocrania, ou então atraso no desenvolvimento sem episódios agudos de descompensação (MARINERO *et al*, 1995).

Os prejuízos ao SNC já iniciam intra-útero e podem, em alguns casos, resultar em malformações do desenvolvimento cortical frontal e temporal (HOFFMAN and ZSCHOCKE, 1999). Os núcleos da base podem ser afetados, causando distonia e discinesia, com perda neuronal, fibrose dos núcleos e degeneração do globo pálido (KÖLKER *et al.*, 2000c). No decorrer dos anos pode haver envolvimento da substância branca, podendo haver comprometimento intelectual (HOFFMAN and ZSCHOCKE, 1999; HOFFMAN, 1996, BEAUCHAMP, 2009).

O diagnóstico é feito por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, que detectam aumento da excreção urinário de AG e 3-OHGA na urina (KÖLKER *et al.*, 2006). Também pode-se identificar elevação da glutaril carnitina nos líquidos biológicos e diminuição dos níveis de carnitina livre (ZIADEH *et al.*, 1995). Em pacientes não excretadores, isto é, sem a presença dos ácidos na urina, a atividade da GCDH pode ser medida em fibroblastos ou leucócitos (SCRIVER *et al.*, 2001).

O tratamento dos pacientes baseia-se basicamente em restrição de lisina, hidroxilisina e triptofano na dieta e administração de carnitina e riboflavina (KÖLKER *et al.*, 2011). Agentes farmacológicos como benzodiazepínicos e valproato podem ser utilizados para amenizar os sintomas neurológicos desencadeados pela doença (MARINERO *et al.*, 1995; HOFFMAN *et al.*, 1996).

1.2.2 O modelo para AGI

Em 2002 Koeller e colaboradores desenvolveram um modelo de camundongo deficiente para a enzima GCDH através de recombinação homóloga em células-tronco. A completa perda de atividade da enzima foi confirmada por ensaios enzimáticos em amostras do fígado. Os animais *Gcdh*^{-/-} apresentam altos níveis de excreção de ácido glutárico e 3-OH-glutárico na urina e grande quantidade de glutaril-carnitina e glutaril-glicina, semelhante àqueles em pacientes com AGI, os quais também estão presentes em níveis elevados no cérebro.

Como, conforme relatado pelos autores (KOELLER *et al.*, 2002), esse modelo não reproduz o fenótipo neurológico e a degeneração estriatal característica dos pacientes afetados, um aperfeiçoamento do modelo foi proposto em 2006 por Zinnanti e colaboradores, através da administração de uma dieta com sobrecarga de lisina, com o propósito de induzir encefalopatia nos animais. Os animais

submetidos a esta dieta apresentam obliteração ventricular cerebral e formação de grandes vacúolos e dilatação capilar no córtex e no estriado, quando comparados a animais *Gcdh*^{-/-} submetidos a uma dieta normal. Há uma grave perturbação na arquitetura cortical com perda neuronal e gliose evidente no córtex e no hipocampo.

Estudos em outros modelos experimentais de AGI têm mostrado um desequilíbrio entre a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica (LIMA *et al*, 1998) induzida pela administração intraestriatal de ácido glutárico (STOKKE *et al*, 1976) em AGI, o que pode estar envolvido no mecanismo de excitotoxicidade e a hiperexcitabilidade descrita nestes animais. Existem ainda relatos de diminuição nos níveis de ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central provavelmente causada pela inibição da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) pelo acúmulo dos ácidos orgânicos citados (STOKKE *et al*, 1976). Déficits na inibição mediada pelo GABA podem por sua vez contribuir para a epileptogênese observada em pacientes com AGI.

1.3 EPILEPTOGÊNESE

A epilepsia é uma desordem do SNC caracterizada por crises epiléticas súbitas, espontâneas e recorrentes causadas por descargas excessivas, hipersincrônicas e anormais de populações de neurônios encefálicos. As causas de epilepsia são múltiplas, e resultam num desequilíbrio entre a excitação e a inibição (BROMFIELD *et al*, 2006). Epilepsia afeta cerca de 25-50/100 mil pessoas em países desenvolvidos e 30-115/100 mil pessoas em países em desenvolvimento, sendo mais comum nos primeiros anos de vida e em idosos (ZENTENO and RONQUILLO, 2012).

Particularmente, uma das causas de epilepsia nos primeiros anos de vida inclui alguns erros inatos do metabolismo. Já é bem estabelecido na literatura que os ácidos orgânicos acumulados estão relacionados com aumento de excitabilidade neuronal, como no caso da AGI. Crises epilépticas têm sido relatadas em modelos animais e em pacientes com AGI (PÖGE *et al*, 1997. HARTLEY *et al*, 2001; FUNK *et al*, 2005; KÖLKER *et al*, 2006; BEAUCHAMP *et al*, 2009, MAGNI *et al*, 2012). Além disso, vários mecanismos como diminuição da recaptação de glutamato (BALCAR *et al*, 1972, BENNET *et al*, 1973. ROSA *et al*, 2007), diminuição da atividade da bomba Na^+K^+ -ATPase (AMARAL *et al*, 2012), e inibição da GAD (STOKKE *et al*, 1976; GOODMAN *et al*, 1995) entre outros, parecem contribuir para um aumento da excitabilidade do sistema.

1.4 HIPÓTESE

Considerando o desequilíbrio de neurotransmissão excitatória e inibitória no SNC, induzido pelo acúmulo de ácidos orgânicos devido à deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), é provável que os animais *Gcdh*^{-/-} tratados com uma dieta com sobrecarga de lisina apresentem mudanças no padrão de liberação de glutamato e GABA, levando a um aumento da excitabilidade neuronal e consequente aumento da susceptibilidade para crises epilépticas, ou ainda, desenvolvimento de crises epilépticas espontâneas.

2. OBJETIVOS

Para testar nossa hipótese temos os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o desenvolvimento de crises epiléticas dos animais *Gcdh*^{-/-} tratados com uma dieta com sobrecarga de lisina e mudanças na liberação dos neurotransmissores glutamato e GABA que possam estar contribuindo com a epileptogênese em AGI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar a presença de crises epiléticas espontâneas por vídeo-eletoencefalograma (EEG);

2) Avaliar o padrão de oscilações cerebrais dos animais registradas por EEG com eletrodos subdurais;

3) Avaliar o aumento da susceptibilidade às crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), analisando a latência, frequência e intensidades das crises registradas por vídeo-EEG;

4) Avaliar as mudanças na liberação de glutamato, GABA em sinaptossomas de córtex por HPLC;

5) Avaliar o imunoconteúdo de vGLUT1, vGAT e GAD no córtex por *Western blot*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos mutantes para a enzima glutaril-CoA desidrogenase (*Gcdh*^{-/-}), com idade de 27 a 40 dias pós-natal (P27-40), de ambos os sexos, desenvolvidos por Köeller e colaboradores (2002). Como controles foram utilizados animais *Gcdh*^{+/+}, de mesma idade e de ambos os sexos. Os animais foram fornecidos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e pelo HCPA, genotipados e transportados para o Biotério do Departamento de Bioquímica UFRGS em veículo climatizado. Os animais foram mantidos na sala de passagem dos camundongos, climatizada (22-26°C, umidade constante) e submetida a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro (luzes acesas das 7 às 19 h durante todo o ano), no Biotério do Departamento de Bioquímica–Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco (antes da implantação dos eletrodos) e 1 (após a implantação dos eletrodos) por gaiola de *plexiglass* (27x16x12 cm), com assoalho contendo maravalha seca e limpa - composta por restos do corte de madeira, principalmente uma serragem grossa e lascas -, trocada a cada dois dias. Os animais tiveram livre acesso à água e ração padrão (0,9 % lisina e 20% de proteínas - NUVILAB) ou com sobrecarga de lisina (20% de proteínas sendo 4,7% de lisina), equivalente a aproximadamente 3 e 5 vezes à quantidade encontrada na dieta normal. Cumprindo a diretriz legal brasileira – Lei nº 11.794/2008 (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794, 8 de outubro de 2008), todos os procedimentos experimentais com animais vivos envolveram o mínimo de desconforto ou sofrimento. O manuseio dos animais

experimentais foram realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da *International Brain Research Organization* (IBRO) e do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (nº 12-0472).

Os animais foram divididos em 4 grupos:

- 1) Grupo controle (camundongos $Gcdh^{+/+}$) com dieta normal;
- 2) Grupo controle (camundongos $Gcdh^{+/+}$) com dieta rica em lisina: 4,7% de lisina, iniciada no período pós natal de 28 dias (P28), a qual persistiu durante 7 a 10 dias;
- 3) Grupo $Gcdh^{-/-}$ com dieta normal;
- 4) Grupo $Gcdh^{-/-}$ com dieta rica em lisina: 4,7% de lisina, iniciada no período pós natal de 28 dias (P28), a qual persistiu durante 7 a 10 dias.

Como não houve diferença significativa entre os grupo $Gcdh^{+/+}$ com e sem dieta em nenhum dos parâmetros investigados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, todos estes animais foram unidos em um grupo, chamado “controle”.

3.2 ELETROFISIOLOGIA *IN VIVO*

Para avaliar a presença de crises epiléticas espontâneas, bem como o aumento da susceptibilidade a crises epiléticas induzidas, foram utilizados procedimentos eletrofisiológicos *in vivo*.

3.2.1 Implantação dos eletrodos

Os procedimentos foram realizados na sala de cirurgia das instalações do biotério no Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os camundongos com 27 dias pós-natal (P27) foram anestesiados com quetamina : xilazina (80-120 mg/kg: 10-16mg/kg, ip 20 - 40 min. de anestesia) (Disponível em: <http://www.research.psu.edu/arp/anesthesia/injectable-anesthesia>). Após, cada animal foi cuidadosamente posicionado em um aparelho estereotáxico e o crânio exposto por incisão com um bisturi na região dorso-central da cabeça. Quatro pequenas aberturas foram realizadas no crânio com o auxílio de uma broca odontológica seguindo coordenadas para implantação dos eletrodos. Dois eletrodos subdurais de registro de aço inox (diâmetro=1mm) foram colocados sob o córtex temporal bilateralmente (1,2 mm lateral, D ou E, e 2,0 mm posterior ao bregma) (Paxinos e Franklin, 2004). O eletrodo de referência foi colocado em abertura feita no osso occipital 1.2 mm lateral D. Um parafuso foi inserido na abertura feita na parte ventral do crânio para fixação e aterramento. Os eletrodos foram fixados com cimento acrílico dentário. Todo o procedimento durou entre 10-20 min. Ao final, o animal foi retirado do estereotáxico. Cada animal recebeu analgesia com Cetoprofeno (anti-inflamatório não esteróide) 5 mg/kg sc, 2 doses nas primeiras 24 h após a cirurgia para amenizar qualquer desconforto decorrente de dor devido ao procedimento cirúrgico de implantação dos eletrodos (<http://www.research.psu.edu/arp/anesthesia/analgesic-drugs-and-delivery>). O animal não foi retirado das instalações do biotério, sendo colocado na gaiola de plexiglass (27x16x12 cm) nas condições descritas acima (1 animal por caixa após a cirurgia) e monitorado até os dias de registro.

3.2.2 Registros eletrofisiológicos *in vivo*

Registros de EEG associados com monitorização por vídeo foram realizados nos animais 1 dia após a cirurgia de implantação de eletrodos (P28). Cada animal (1 por vez) foi transferido para a caixa de observação e os eletrodos foram conectados a um amplificador (MAP-32, Plexon Inc.) para aquisição de vídeo-EEG, ficando o animal livre para se movimentar. No período do primeiro registro de 1h de duração, todos os animais (P28) estavam recebendo dieta normal (registro basal). A partir do segundo dia (P29) os registros de vídeo-EEG foram realizados durante 3 horas/dia.

Os registros foram filtrados, digitalizados e armazenados para análise juntamente com os vídeos. Foram avaliadas presença, frequência e severidade das crises epiléticas espontâneas. Após cada registro o animal foi transferido para a gaiola de plexiglass (27x16x12 cm), e mantido nas condições descritas acima até o próximo registro. Após o período de 10 dias, crises epiléticas foram induzidas com pentilenotetrazol (PTZ) (60mg/kg i.p.), antagonista GABA_A. Latência, intensidade e frequência de crises foram avaliadas durante 1h de registro pós PTZ e classificadas de acordo com a escala de Racine (Racine, 1972; Zipancic, Calcagnotto *et al*, 2010) (ver seção II.1.6). Os registros foram filtrados, digitalizados e armazenados para análise.

3.3 PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSSOMAS

Os animais foram sacrificados, decapitados e os cérebros removidos. O córtex cerebral de cada animal foi isolado, pesado e homogeneizado em tampão sacarose (sacarose 0,32M, EDTA 1mM, DTT 0,25mM), sendo adicionado volume equivalente a 9X o peso da estrutura. O homogeneizado foi centrifugado (10min,

4°C, 1000g) e o sobrenadante (S1) coletado. O *pellet* foi ressuspenso em metade do volume anterior de tampão sacarose e novamente centrifugado (10min, 4°C, 1000g). O sobrenadante (S2) foi coletado, adicionado ao S1 e centrifugado (20min, 4°C, 11000g). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 1ml de tampão HBSS (do inglês – Hank's Buffered Salt Solution) e centrifugado (10min, 4°C, 14000g) para remoção da sacarose. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em meio com baixa concentração de potássio, o qual não provoca a despolarização da membrana celular (meio não despolarizante: tampão HBSS baixo potássio) (400µl de tampão). Uma alíquota do sinaptossoma foi utilizada imediatamente para a quantificação da liberação dos neurotransmissores por HPLC (ver sessão II.1.4) e o restante foi armazenado a -20°C para posterior análise do imunoconteúdo protéico por *Western blot* (ver sessão II.1.5).

3.4 LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E GABA POR DESPOLARIZAÇÃO COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO EM SINAPTOSSOMAS

Um volume de 100µl de sinaptossoma foi pipetado em 900µl de meio não despolarizante (HBSS com baixo potássio) ou meio com alta concentração de potássio que causa a despolarização da membrana celular (meio despolarizante: HBSS com alto potássio) e incubados por 1min a 37°C, seguido por centrifugação (1min, 4°C, 14000g). O sobrenadante foi coletado para posterior análise por HPLC.

3.4.1. Quantificação de glutamato e GABA por HPLC

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) foi realizada com alíquotas de sobrenadante dos sinaptossomas estimulados ou não por meio com alto potássio. As amostras

foram derivatizadas com o-ftalaldeído e a separação foi realizada através de uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250mm×4,6mm, Supelco) em um cromatógrafo líquido Shimadzu (válvula de injeção em laço 50µL). A fase móvel fluiu a taxa de 1,4mL/min e a temperatura da coluna foi de 24°C. As composições dos tampões foram A: tampão fosfato de sódio monoidratado 0.04 mol/L, pH 5.5, contendo 20% de metanol; B: tampão fosfato de sódio monoidratado 0.01 mol/L, pH 5.5, contendo 80% de metanol. O padrão do gradiente foi modificado de acordo com o tampão B na fase móvel: 0% a 0.00 min, 25% a 13.75 min, 100% a 15.00–20.00 min, 0% a 20.01–25.00 min. A absorbância foi lida a 360nm (excitação) e 455nm (emissão) em um detector de fluorescência Shimadzu. Foram utilizados 50µL de amostra e a concentração expressa em µM/ µg de proteína.

3.5 WESTERN BLOT

As amostras de sinaptossoma foram solubilizadas em 25% (v/v) de uma solução contendo 40% de glicerol, 5% de mercapto-etanol e 50mM de Tris-HCl, pH 6,8. Concentrações iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5% para eletroforese. Posteriormente, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose por 1h a 15V em tampão de transferência (Trizma 48mM, glicina 39mM, metanol 20%, SDS 0,25%). Foram então lavadas por 10min em tampão Tris-salina (TBS – NaCl 0,5M, Trizma 20mM, pH 7,5) seguido por 2h de incubação em solução bloqueadora (TBS com 5% de albumina bovina, fração V). Após a incubação, a membrana foi lavada duas vezes por 5min com solução bloqueadora mais Tween-20 0,05% (T-TBS) e então incubada durante a noite a 4°C em solução bloqueadora contendo um dos seguintes anticorpos monoclonais: anti-vGLUT1 (SIGMA), anti-vGAT (ABCAM) e anti-sinaptofisina (SIGMA), anti-vATPase (Santa

Cruz) e anti-GAD (ABCAM). A membrana então foi lavada duas vezes por 5min com T-TBS e incubada por 2h em solução de anticorpos contendo peroxidase conjugada com IgG anti-camundongo ou peroxidase conjugada com IgG anti-coelho diluída 1:2000. A membrana foi novamente lavada duas vezes por 5min com T-TBS e duas vezes por 5min com TBS e então revelada usando um substrato da peroxidase que emite quimiluminescência e detectadas usando filmes de raio-X. Os filmes foram digitalizados e as intensidades das bandas foram analisados usando o software Image J. (desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde dos EUA e disponível na Internet, no <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os registros de EEG armazenados foram convertidos pelo software MATLAB para um formato de arquivo apropriado (*abf*) e então analisados quanto à presença ou ausência de crises espontâneas e/ou induzidas usando o software Clampfit 10.0 (Molecular Devices).

Para uma análise quantitativa os traçados de EEG foram decompostos em 3 bandas de frequência: delta (1-4Hz), teta (4-10Hz) e gama (20-50Hz). Tal análise retorna um valor de P (*power*), que pode ser definido como a quantidade existente de cada banda de frequência dentro do traçado total. Foram medidos os valores de P basal para os animais (um dia após a cirurgia e antes do início da dieta com sobrecarga de lisina) e final (4 dias após o início da dieta com sobrecarga de lisina). Lembrando que um grupo de animais *Gcdh*^{-/-} e um grupo de animais *Gcdh*^{+/+} receberam dieta normal. O *script* detalhado para a decomposição dos traçados e para a construção dos espectrogramas consta no Anexo 1.

As crises foram avaliadas quanto à latência, frequência, duração e severidade segundo a escala de Racine (Racine, 1972): (0) sem alterações; (1) automatismos orofaciais; (2) mioclonias (às vezes acompanhadas de balanço da cabeça e da cauda); (3) clonia unilateral ou bilateral das patas dianteiras; (4) clonia bilateral das patas dianteiras com elevação do tronco; (5) elevação do tronco, perda da postura, crises tônico-clônicas generalizadas que podem resultar em morte.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos utilizando-se o software GraphPad Prism 5. Os testes utilizados e o nível de significância correspondente são mencionados em cada resultado.

4.RESULTADOS

4.1 ANIMAIS *GCDH*^{-/-} SUBMETIDOS À DIETA COM SOBRECARGA DE LISINA APRESENTAM CRISES EPILÉPTICAS ESPONTÂNEAS

Registros de vídeo-EEG basal foram realizados nos animais um dia após a implantação dos eletrodos. Posteriormente estes animais foram divididos em 4 grupos: *Gcdh*^{+/+} com e sem dieta com sobrecarga de lisina (n=17) (grupo controle), *Gcdh*^{-/-} com dieta normal (n=15) (grupo *Gcdh*^{-/-}) e *Gcdh*^{-/-} com dieta com sobrecarga de lisina (n=18) (grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis). Como não houve diferenças significativas entre os grupos *Gcdh*^{+/+} com e sem dieta todos estes animais foram unidos em um grupo, chamado “controle”. Cada animal foi registrado durante 3h/dia por 10 dias. A análise detalhada dos registros de vídeo-EEG mostrou que 13/18 (72%) animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentaram crises epiléticas espontâneas e 4/18 (22%) morreram 4 dias após o

início da dieta. Nenhum animal dos grupos controle ou *Gcdh*^{-/-} apresentou qualquer manifestação de crise espontânea ou mortalidade (Fig. 2).

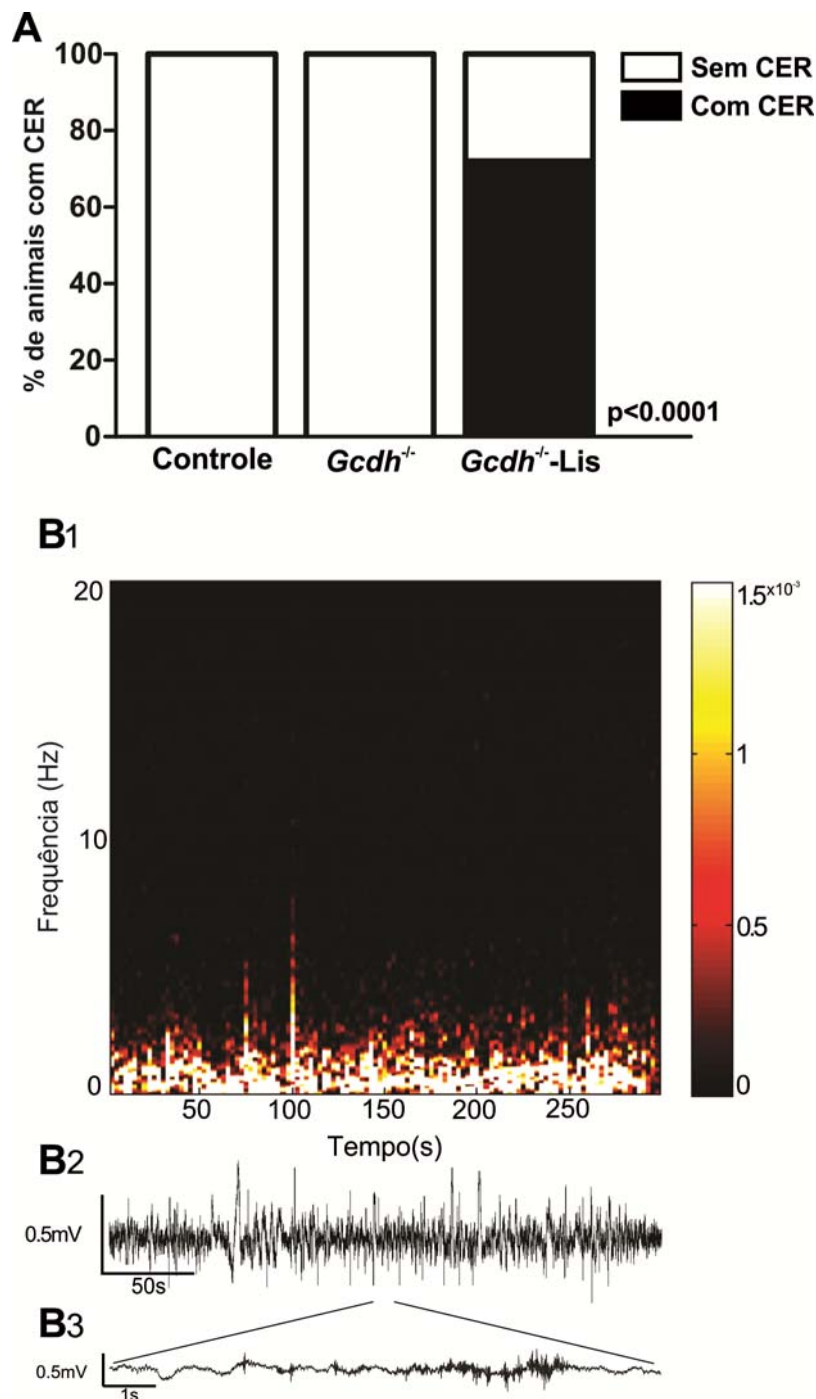


Figura 2 – Somente animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentam crises epilépticas espontâneas e recorrentes (CER). A: Porcentagem de animais com CER (*Qui-quadrado*, $p < 0.001$). **B:** Espectrograma (1) e traçado de EEG (2) representativos mostrando a presença de pequenas crises epilépticas espontâneas e recorrentes em *Gcdh*^{-/-}-Lis. Traçado de EEG expandido de um evento ictal (3).

4.2 OCORRE DIMINUIÇÃO DAS OSCILAÇÕES TETA E GAMA NOS ANIMAIS *GCDH*^{-/-} SUBMETIDOS À DIETA COM SOBRECARGA DE LISINA

Os registros dos animais foram submetidos à análise detalhada em MATLAB (vide material e métodos) e são mostrados como espectrogramas nas figuras 4 e 5. A figura 3 mostra uma razão entre as frequências altas (teta e gama) e a frequência baixa (delta) logo após a cirurgia e 4 dias após o início de dieta normal ou com sobrecarga de lisina, permitindo visualizar que, somente os animais *Gcdh*^{-/-} submetidos a uma dieta com sobrecarga de lisina apresentam diminuição das frequência teta e gama ($-0,58 \pm 0,42$, $n=10$) quando comparados aos grupos *Gcdh*^{-/-} ($0,615 \pm 0,35$, $n=6$) e controle ($0,473 \pm 0,16$, $n=9$) (*Qui-quadrado*, $p < 0,05$). As médias dos valores de P (*power*) para cada faixa de frequência são apresentadas na tabela 1.

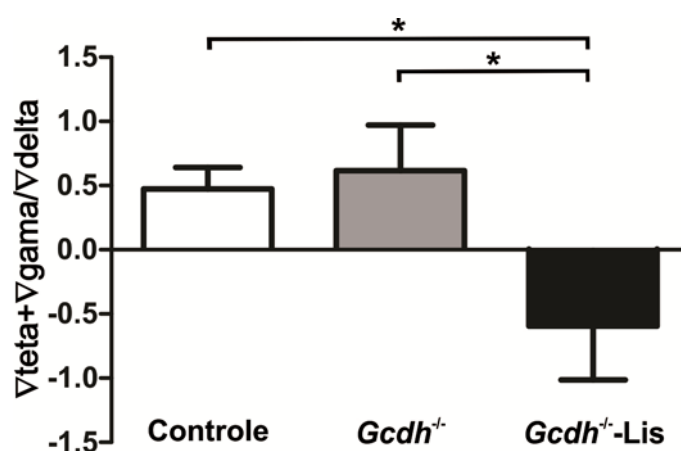


Figura 3 – Animais *Gcdh*^{-/-} apresentam diminuição nas oscilações teta e gama predominando as oscilações lentas (delta) após a dieta com sobrecarga de lisina (ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnet de múltiplas comparações, $*p < 0,05$).

Tabela 1 – Média dos valores de P das frequências delta, teta e gama nos diferentes grupos de animais. Note que somente no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis ocorre diminuição significativa das frequências teta e gama (*Qui-quadrado*, **p*<0,05).

Grupo	Valor de P	Delta (1-4Hz)	Teta (4-10Hz)	Gama (20-50Hz)
<i>Gcdh</i>^{-/-}-Lis n=9	P basal	0,0020±0,0002	0,0029±0,0007*	0,0008±0,0002*
	P final	0,0017±0,0003	0,0014±0,0005*	0,0004±0,0001*
<i>Gcdh</i>^{-/-} n=5	P basal	0,0018±0,0002	0,0017±0,0005	0,0006±0,0001
	P final	0,0016±0,0002	0,0024±0,0008	0,0008±0,0003
Controle n=15	P basal	0,0028±0,0001	0,0014±0,0002	0,0004±0,00004
	P final	0,0020±0,0002	0,0021±0,0002	0,0006±0,00007

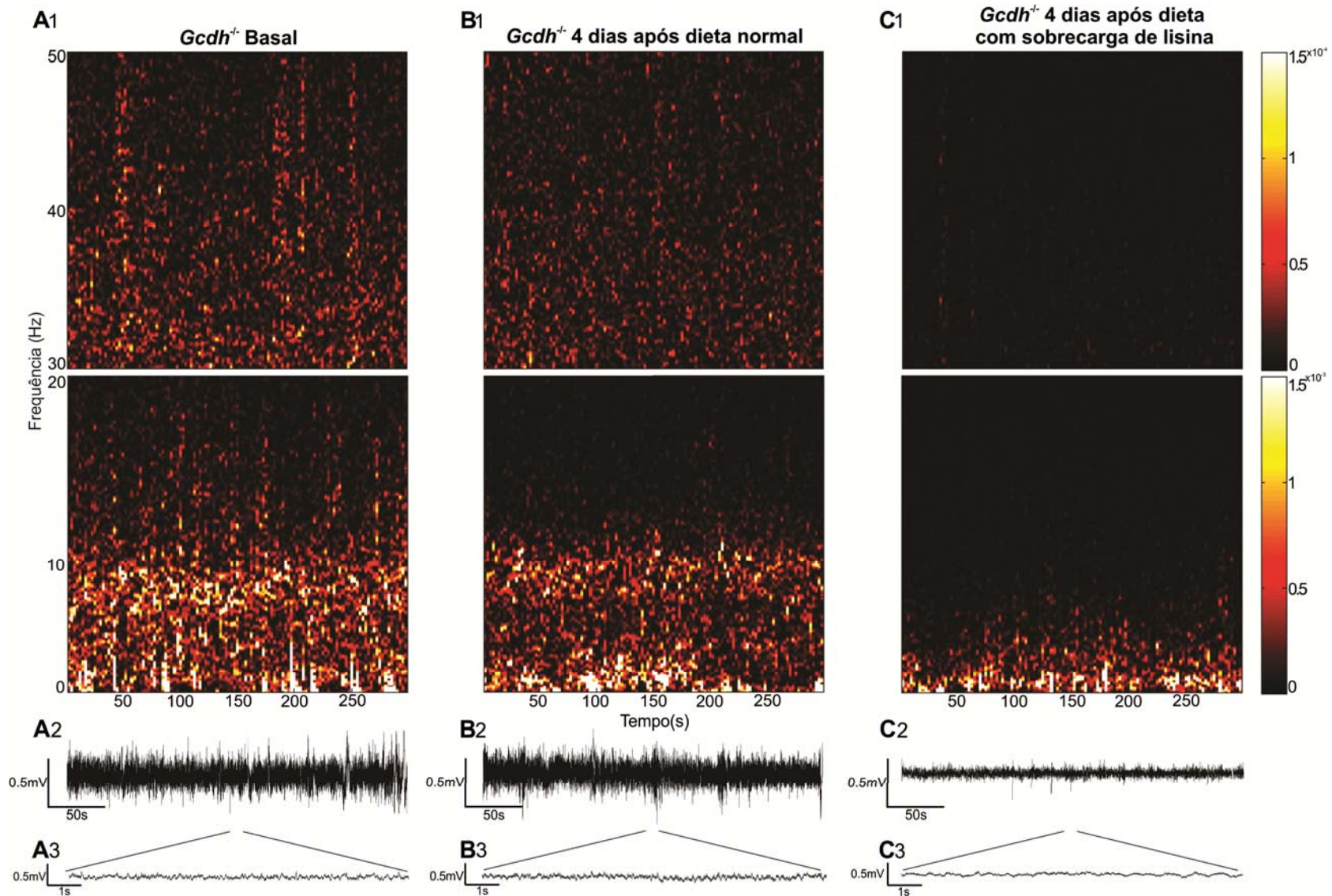


Figura 4 – Predominância de oscilações lentas em animais *Gcdh*^{-/-}-Lis. Espectrogramas (1) e traçados de EEG (2) representativos dos animais nocaute para glutaril-CoA desidrogenase. Traçados de EEG expandidos (3). **A:** *Gcdh*^{-/-}-Lis basal (antes do início da dieta e dois dias após a cirurgia). **B:** *Gcdh*^{-/-} 4 dias após a início da dieta normal. **C:** *Gcdh*^{-/-}-Lis 4 dias após o início da dieta com sobrecarga de lisina.

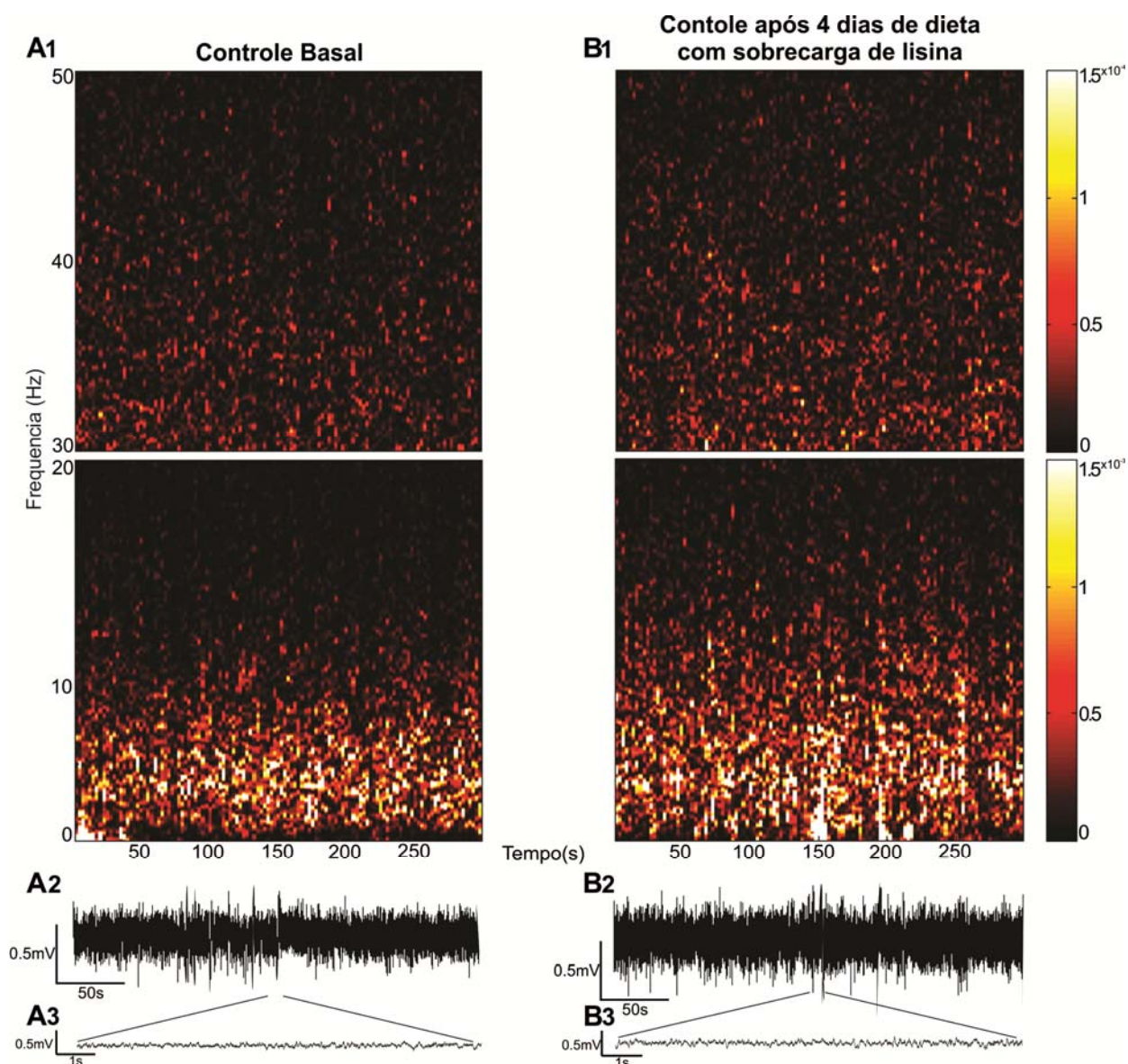


Figura 5 - Animais controle não apresentam alterações no padrão de oscilações cerebrais. Espectrogramas (1) e traçados de EEG (2) representativos dos animais controle. Traçados de EEG expandidos (3). **A:** Controle basal (antes do início da dieta e dois dias após a cirurgia). **B:** Controle 4 dias após o início da dieta com sobrecarga de lisina. Nota: Animais controle 4 dias após o início da dieta normal apresentaram resultados semelhantes (dado não mostrado).

4.3 AUMENTO DA SEVERIDADE DAS CRISES EPILÉPTICAS INDUZIDAS POR PTZ NOS ANIMAIS *GCDH*^{-/-} SUBMETIDOS À DIETA COM SOBRECARGA DE LISINA

Para analisar a suscetibilidade a crises epiléticas induzidas os animais receberam injeção do antagonista GABAérgico pentilenotetrazol (PTZ) (60mg/kg, i-p) 13 dias após a cirurgia (P40). As médias dos vários parâmetros analisados \pm o erro padrão podem ser visualizadas na Tabela 2. A figura 6 mostra o espectrograma de uma crise estágio V induzida por PTZ (A) e o traçado correspondente (B). Nas crises pequenas (estágios I-III) houve diferença significativa apenas entre o grupo controle (em média 8 crises) e o grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis (em média 22 crises) (Figura 7, A) (Kruskal-Wallis seguido de múltipla comparação de Dunn, $p < 0,05$). Também verificamos que os animais *Gcdh*^{-/-}-Lis tiveram mais crises severas (estágios IV-V) do que os animais controle e *Gcdh*^{-/-} (Figura 7, B) (Kruskal-Wallis seguido de múltipla comparação de Dunn, $p < 0,05$). Não foram verificadas diferenças entre os grupos quanto ao número total de crises epiléticas (Figura 7, C). Todos os animais *Gcdh*^{-/-} tratados com dieta com sobrecarga de lisina (10/10) apresentaram crises epiléticas severas (estágios IV-V) contra 86% (7-8) dos animais *Gcdh*^{-/-} sem dieta e 73% (9/12) do grupo controle (Figura 7, D) (Qui-quadrado, $p < 0,0001$). Portanto, a porcentagem de crises severas (IV-V) foi significativamente maior nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis (27%) quando comparado aos grupos *Gcdh*^{-/-} com dieta normal (8%) e controle (10%) (Figura 6, E) (Qui-quadrado, $p < 0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas no número total de crises, na duração ou na latência para a primeira crise (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização das crises epilépticas induzidas por PTZ nos diferentes grupos de animais.

Grupos	Nº de crises I-III	Nº de crises IV-V	Nº total de crises	Latência (s)	Duração I-III (s)	Duração IV-V (s)	Duração total (s)	Morte *
Controle	8±1 n=12	1±1 n=12	8±1 n=12	66,8±8,6 n=12	0,79±0,3 n=8	59,4±20,9 n=6	45,35±18,2 n=8	8 n=12
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	16±3 n=8	1±1 n=8	17±3 n=8	69,5±7,9 n=8	0,76±0,1 n=8	41,7±5,4 n=8	42,45±5,3 n=8	5 n=8
<i>Gcdh</i> ^{-/-} - Lis	22±5 n=11	2±1 n=14	20±5 n=14	57,4±6,3 n=14	1,4±0,8 n=6	47,6±25 n=6	49±24,7 n=6	5 n=14

*nº de mortes em cada grupo

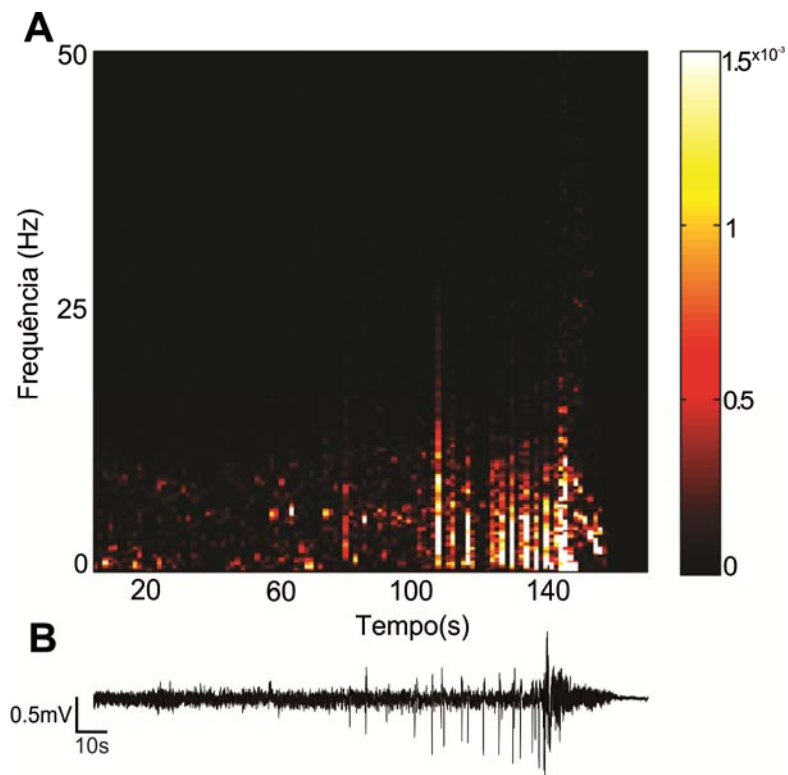


Figura 6 – Crise epiléptica estágio V induzida por PTZ (60mg/kg, i-p). Espectrograma (A) e traçado de EEG (B) representativos de uma crise severa induzida por pentilenotetrazol.

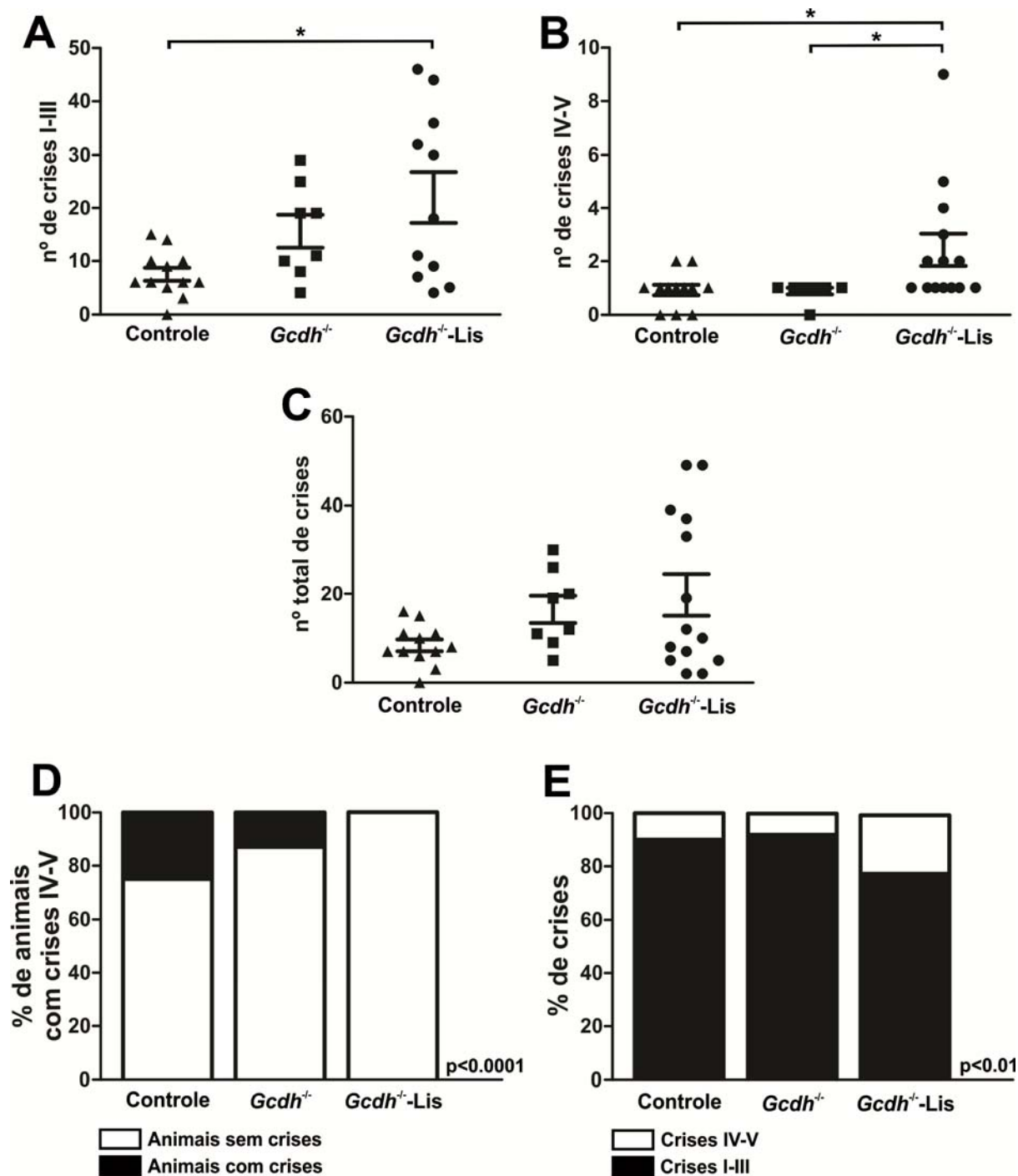


Figura 7 – Animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis exibem aumento da suscetibilidade a crises epiléticas induzidas por PTZ (60mg/Kg i-p). A: Número de crises epiléticas leves (estágios I-III) (*Kruskal-Wallis seguido de múltipla comparação de Dunn, * $p < 0,05$*). B: Número de crises epiléticas severas (estágios IV-V) (*Kruskal-Wallis seguido de múltipla comparação de Dunn, * $p < 0,05$*). C: Note que não existe diferença no número total de crises epiléticas entre os grupos D: Porcentagem de animais com crises epiléticas severas (estágios IV-V) (*Qui-quadrado, $p < 0,0001$*). E: Porcentagem de crises epiléticas em diferentes estágios de severidade (estágios I-III e IV-V) (*Qui-quadrado, $p < 0,01$*).

4.4 ANÁLISE POR HPLC MOSTRA MUDANÇAS NO PADRÃO DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E GABA EM SINAPTOSSOMA DE CÓRTEX DOS ANIMAIS NOCAUTE PARA GCDH

Para verificar se a presença de crises epiléticas espontâneas e o aumento de suscetibilidade às crises induzidas são decorrentes de alterações na liberação de neurotransmissores, avaliamos a liberação de glutamato e GABA em preparação de sinaptossomas corticais por HPLC em duas situações: basal e após despolarização induzida pelo aumento da concentração de potássio. Os dados detalhados são apresentados na Tabela 3.

A liberação de glutamato basal e após despolarização no córtex nos grupos *Gcdh*^{-/-} e *Gcdh*^{-/-}-Lis foi significativamente menor quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,05$) (Figura 8, A, B). Para uma melhor visualização da possível alteração na liberação de neurotransmissores com a despolarização, os dados também foram expressos como porcentagem de liberação após a despolarização em relação ao basal. Desta forma observamos que a porcentagem de glutamato liberado após despolarização aumentou significativamente no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis quando comparado com o grupo *Gcdh*^{-/-} e controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,05$) (Figura 8, C). Isto pode sugerir que os terminais sinápticos no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentam uma sensibilidade maior à despolarização. Da mesma forma, a liberação de GABA basal e após despolarização, nos animais *Gcdh*^{-/-} e *Gcdh*^{-/-}-Lis foi significativamente menor quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,05$) (Figura 8, D, E), porém a porcentagem de

GABA liberado após a despolarização foi semelhante em todos os grupos (Figura 8, F). Isto pode sugerir uma diminuição do aporte de GABA pelas sinapses.

Tabela 3 – Liberação de glutamato e GABA em sinaptossomas corticais dos diversos grupos de animais.

	Grupo	Liberação Basal ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$)	Liberação após despolarização	% de liberação após despolarização em relação ao basal
CÓRTEX	Glutamato			
	Controle	29422 \pm 2371 n=16	53442 \pm 2199 n=16	93 \pm 11, n=16
	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	8466 \pm 1865 n=8	14551,91 \pm 2013,50 n=8	89,13 \pm 23,92 n=8
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Lis	5933 \pm 1147 n=9	16958 \pm 3346 n=9	235 \pm 46 n=9
	GABA			
	Controle	2436 \pm 190 n=11	8017 \pm 459 n=11	241 \pm 21 n=11
	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	1413 \pm 127 n=8	4275,681302,44 n=8	214,52 \pm 29,52 n=8
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Lis	1056 \pm 180 n=11	3903 \pm 567 n=11	308 \pm 37 n=11

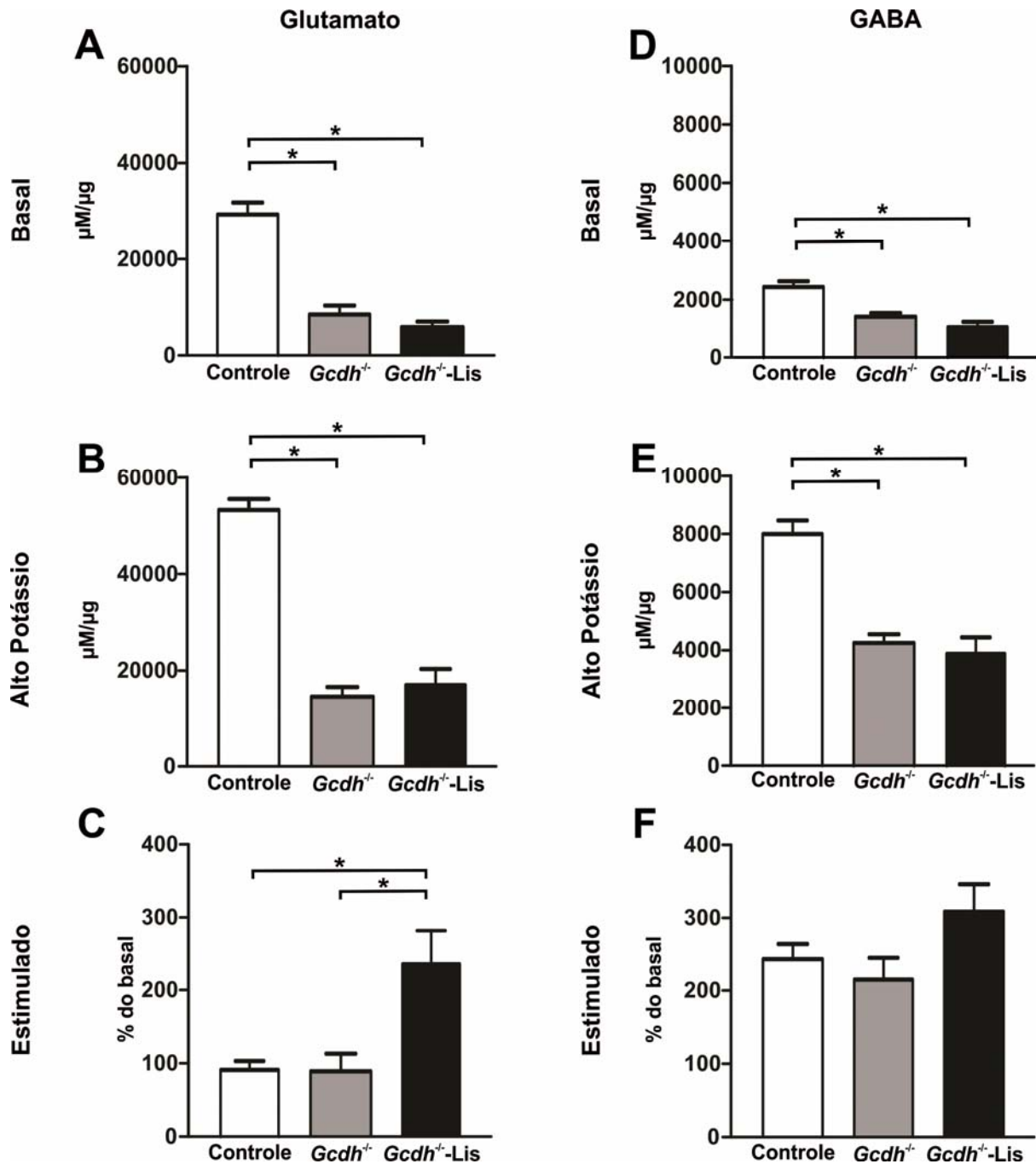


Figura 8 – Análise por HPLC mostra mudança na quantidade de liberação de glutamato e GABA em sinaptossoma cortical. A: Liberação basal de glutamato. **B:** Liberação de glutamato após estimulação pela adição de alto potássio. **C:** Porcentagem de liberação de glutamato em relação ao basal. **D:** Liberação basal de GABA. **E:** Liberação de GABA após estimulação pela adição de alto potássio. **F:** Porcentagem de liberação de GABA em relação ao basal. Dados apresentados em µM/µg de proteína. (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, * $p < 0,05$).

4.5 INVESTIGAÇÃO POR *WESTERN BLOT* MOSTRA UMA DIMINUIÇÃO DO IMUNOCONTEÚDO DA GLUTAMATO DESCARBOXILASE NO CÓRTEX DOS ANIMAIS *GCDH^{-/-}-LIS*

Para determinar se a diminuição na liberação de glutamato e GABA no córtex pode ser decorrente de modificações na estrutura das vesículas sinápticas ou na síntese de neurotransmissores, realizamos a quantificação dos transportadores vesiculares de glutamato (vGLUT1) e GABA (vGAT), e da enzima glutamato descarboxilase (GAD) por *Western blot* em sinaptossomas. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Imagens representativas dos géis utilizados para quantificação são mostradas abaixo de cada gráfico.

Não houve diferença significativa no imunoconteúdo dos transportadores vGLUT1 e vGAT entre os grupos (Figura 9, A, B). No entanto houve diminuição significativa do imunoconteúdo da enzima GAD no grupo *Gcdh^{-/-}-Lis* ($64,03 \pm 4,79$, $n=6$) quando comparado aos grupos *Gcdh^{-/-}* ($107,94 \pm 7,39$, $n=6$) e controle ($97,03 \pm 2,97$, $n=11$) (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,05$) (Figura 9, C). Não houve diferença no imunoconteúdo das proteínas constitutivas das vesículas sinápticas V-ATPase e sinaptofisina, utilizadas como controle da quantidade de vesículas sinápticas (Figura 9, D, E).

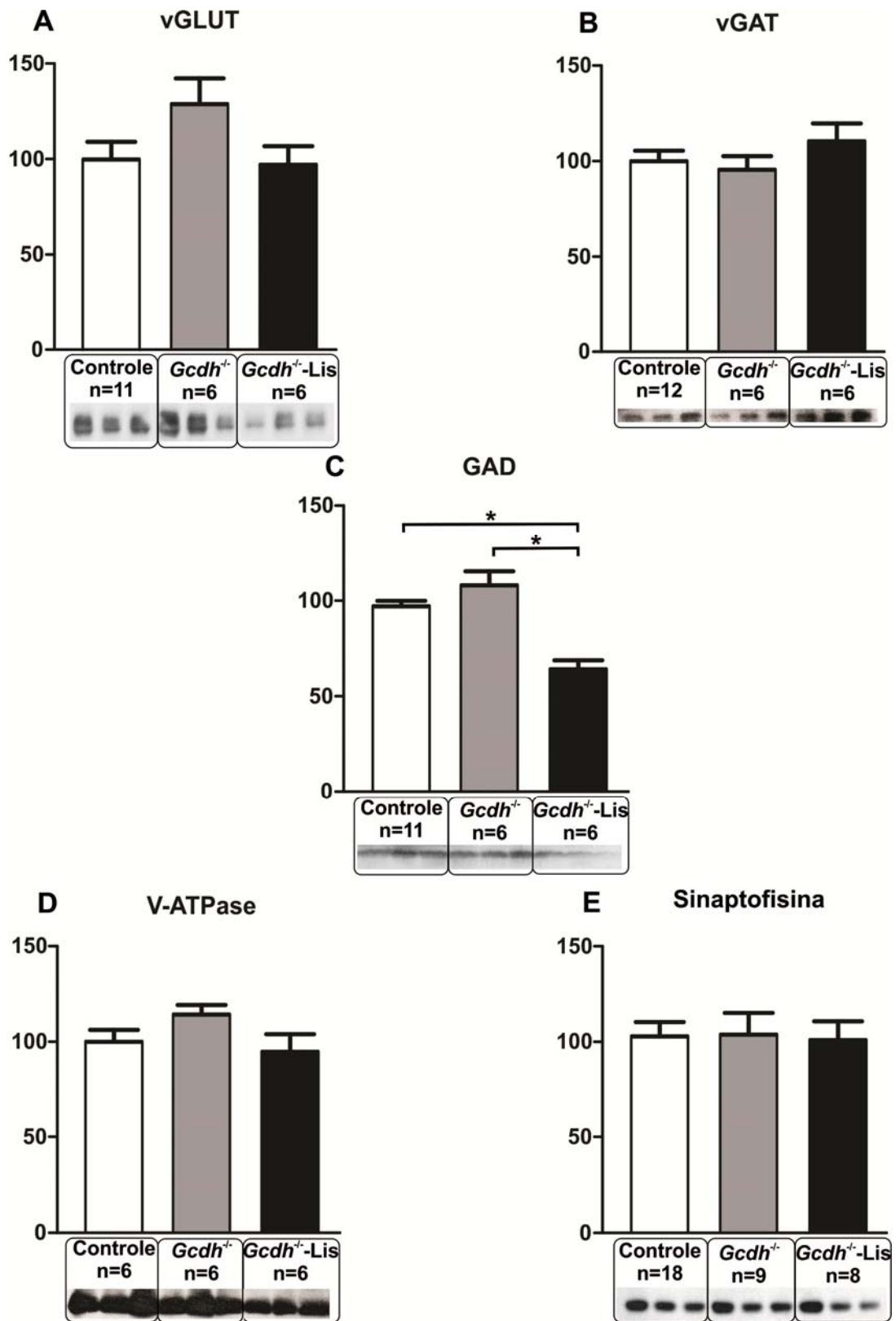


Figura 9 – Diminuição da glutamato descarboxilase em sinaptossomas corticais quantificados por *Western blot*. **A:** Transportador vesicular de glutamato – vGLUT1. **B:** Transportador vesicular de GABA – vGAT. **C:** Glutamato descarboxilase – GAD. **D:** V-ATPase. **E:** Sinaptofisina. (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $*p < 0,05$). Imagens dos géis utilizados para quantificação são mostradas abaixo de cada gráfico (3 bandas por grupo).

5.DISCUSSÃO

Sabemos que o acúmulo de ácidos orgânicos causado pela deficiência de glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) pode levar a um desequilíbrio de neurotransmissão excitatória e inibitória. Neste trabalho avaliamos os níveis de glutamato e GABA corticais e a presença de crises epiléticas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis. Nossos principais resultados mostram que os animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentam (1) hiperexcitabilidade e mudança no perfil dos ritmos cerebrais, (2) déficit na liberação de glutamato e GABA a nível cortical e (3) diminuição do imunoconteúdo de GAD. Os animais *Gcdh*^{-/-} com dieta normal não apresentaram hiperexcitabilidade e mudanças do EEG, porém exibiram diminuição na liberação de glutamato e GABA.

5.1 HIPEREXCITABILIDADE E MUDANÇA NO PERFIL DOS RITMOS CEREBRAIS

Apenas os animais do grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis desenvolveram crises epiléticas espontâneas e um aumento da severidade das crises epiléticas induzidas por PTZ, um antagonista GABA_A, quando comparados com animais controle e *Gcdh*^{-/-} com dieta normal. Nossos achados de aumento de suscetibilidade a crises e o desenvolvimento de crises epiléticas recorrentes no modelo para AGI aparecem de forma bastante semelhante aos relatados em pacientes (PÖGE *et al*, 1997; HARTLEY *et al*, 2001; FUNK *et al*, 2005; KÖLKER *et al*, 2006; BEAUCHAMP *et al*, 2009; MAGNI *et al*, 2012). As crises podem estar diretamente ligadas a um déficit do sistema GABAérgico, como verificado em nossos achados de HPLC e *Western blot*, e ao aumento da liberação de glutamato, como mostrado aqui pelo aumento da

porcentagem dos níveis de glutamato em relação à liberação basal medidos por HPLC nos sinaptossomas.

Excitotoxicidade tem sido proposta como um importante mecanismo neurotóxico na patofisiologia da AGI (FLOTT-RAHMEL *et al*, 1997; KÖLKER *et al*, 1999, 2004a; WAJNER *et al*, 2004; ROSA *et al*, 2004). O aumento de excitabilidade pelos ácidos orgânicos têm mostrado relação com receptores NMDA, e o ácido 3-OHGA tem aparecido como a principal neurotoxina associada a doença (KÖLKER *et al*, 1999; 2000a, b, 2001a, 2002a,b; LATINI *et al*, 2002), com sua administração intraestrial causando crises epilépticas e danos neuronais em ratos (MELLO *et al*, 2001). Um recente trabalho mostrou diminuição da Na⁺,K⁺-ATPase mitocondrial no córtex, o que também poderia estar relacionado com o aumento da excitabilidade (AMARAL *et al*, 2012).

Além disso, os animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentaram diminuição das oscilações cerebrais teta e gama com conseqüente predominância das ondas lentas (delta). O sistema GABAérgico, além de ser importante para o controle da excitabilidade também é fundamental na regulação de circuitos locais (como codificação de informação e plasticidade sináptica) e na sincronização das oscilações da rede neuronal (DE FELIPE *et al*, 2013). De fato, sabe-se que disfunções do sistema GABAérgico geram alterações na ritmicidade cerebral (COBOS *et al*, 2005; BUZSÁKI, 2002). Portanto, é bastante provável que a diminuição da liberação GABAérgica verificada por HPLC e a diminuição das oscilações teta e gama estejam intimamente relacionadas. As oscilações teta têm um papel fundamental no aprendizado e cognição e sua diminuição pode estar relacionada com o impedimento intelectual identificado em alguns pacientes (HOFFMAN, 1996; BEAUCHAMP, 2009). Além disso, padrões de EEG podem ser associados à

diferentes quadros de encefalopatia, e as ondas lentas no EEG são frequentemente vistas em casos de insulto cortical severo (KAPLAN, 2004). Em nosso caso, o predomínio das ondas delta com a diminuição das oscilações teta e gama foi verificada somente nos animais do grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis, sugerindo uma relação com o aparecimento dos sintomas neurológicos de AGI

5.2 DÉFICIT NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E GABA A NÍVEL CORTICAL

Os níveis de glutamato e GABA basais liberados nas preparações de sinaptossomas corticais, tanto dos animais *Gcdh*^{-/-} como *Gcdh*^{-/-}-Lis, foram significativamente inferiores aos controles. Porém, a porcentagem de aumento da liberação de glutamato após despolarização em relação ao basal foi significativamente maior nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis.

Da mesma forma os níveis de GABA basais liberados nas preparações de sinaptossomas corticais tanto dos animais *Gcdh*^{-/-} como *Gcdh*^{-/-}-Lis foram significativamente inferiores aos controles. Por outro lado, não houve diferença na porcentagem de aumento da liberação após despolarização em relação ao basal entre os grupos.

Estas alterações na liberação de glutamato e GABA podem estar associadas com mudanças do número de sinapses e/ou neurônios, na síntese e/ou armazenamento vesicular de neurotransmissores ou na recaptação dos mesmos (CALCAGNOTTO *et al*, 2002, 2005a, 2005b). De fato já foi evidenciado que o ácido glutárico, por ser estruturalmente relacionado ao glutamato, pode atuar como inibidor da recaptação do glutamato em sinaptossomas, causando um acúmulo extracelular do mesmo (BALCAR *et al*; 1972, BENNET *et al*, 1973; ROSA *et al*, 2007).

A hiperatividade do sistema glutamatérgico pode contribuir para a epileptogênese (VAN DER HEL *et al*, 2009). Os transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1-3) que importam glutamato para dentro das vesículas sinápticas são um dos marcadores funcionais da transmissão glutamatérgica (AIHARA *et al*, 2000). vGLUT1 e 2 têm sido identificados especificamente em neurônios glutamatérgicos, porém os vGLUT3 estão presentes em outros neurônios (HERZOG *et al*, 2004). O aumento da expressão de vGLUT1 tem sido observado em neurônios glutamatérgicos em epilepsia (VAN DER HEL *et al*, 2009). Apesar da presença de crises espontâneas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis, observamos que o imunoconteúdo de vGLUT1 nas preparações de sinaptossomas corticais não diferiu entre os grupos de animais. Isto pode ser explicado pelo período agudo de crises epiléticas, isto é, sem a presença de epilepsia estabelecida, porém não se exclui a possibilidade do aumento de vGLUT1 em outras estruturas cerebrais, como por exemplo, o estriado.

Kölker e colaboradores (1999) reportaram que o dano neuronal induzido pelos ácidos glutárico e 3-OH-glutárico *in vitro* foi prevenido pela pré-incubação com antagonistas NMDA, especificamente ifenprodil, um antagonista da subunidade GluN2B. Além disso, o pré-tratamento com MK-801, um antagonista NMDA não-competitivo, impediu crises epiléticas induzidas por administração intraestriatal de ácido glutárico (LIMA *et al*, 1998) mostrando que o sistema glutamatérgico está intimamente ligado aos efeitos ocasionados pelo acúmulo deste ácido orgânico.

Mudanças na quantidade e expressão do transportador vesicular de GABA vGAT estão relacionadas com a epileptogênese e podem variar dependendo da região e da cronicidade. Estudos mostram um aumento do imunoconteúdo de vGAT no hipocampo em modelos animais de epilepsia induzida por pilocarpina e outros

mostram uma diminuição da expressão (BOULLAND *et al*, 2007; LAMAS *et al*, 2005). No nosso trabalho, não detectamos diferenças no imunoconteúdo de vGAT na preparação de sinaptossomas corticais entre os grupos.

Entretanto, observamos uma diminuição significativa do imunoconteúdo de GAD na preparação de sinaptossomas corticais nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis. GAD é a enzima de síntese de GABA a partir da descarboxilação do L-glutamato e existe em duas isoformas: GAD 65 e GAD 67, com diferente distribuição subcelular e propriedades reguladoras (NASREEN *et al.*, 2011). Diminuição na expressão de GAD pode levar à diminuição na produção de GABA e conseqüentemente na sua liberação pelos terminais sinápticos, podendo causar hiperexcitabilidade neuronal e contribuir para a epileptogênese (WANG *et al*, 2011).

O ácido glutárico e outros metabólitos acumulados em AGI têm sido considerados como inibidores competitivos da GAD (STOKKE *et al*, 1976) e diminuição de sua atividade e dos níveis de GABA tem sido relatadas nos gânglios basais de pacientes com AGI (GOODMAN, 1995). Lima e colaboradores (1998) demonstraram que os efeitos de hiperexcitabilidade do ácido glutárico podem ser completamente revertidos com uma baixa dose de muscimol, um agonista GABA_A, o que sugere que defeitos na neurotransmissão GABAérgica sejam responsáveis pelos efeitos do ácido glutárico. Devido à diminuição do tônus GABAérgico nos pacientes, é possível que a inibição da GAD seja um importante fator para a neurotoxicidade vista em AGI, através de um “estado hiperexcitável” que favoreceria a excitotoxicidade.

Além destes mecanismos, mudanças plásticas associadas com a hiperexcitabilidade, incluindo modulação de receptores e alterações moleculares podem contribuir para a epileptogênese (MORIMOTO *et al*, 2004; COSSART *et al*,

2005). Estudos de mecanismos eletrofisiológicos e moleculares envolvidos na epileptogênese dos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis serão foco de futuros experimentos.

6.CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram a presença clara de crises epiléticas espontâneas e aumento da susceptibilidade das crises epiléticas induzidas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis. Isto pode estar, pelo menos em parte, relacionado com a diminuição nos níveis corticais de GABA pela diminuição da enzima GAD, e pelo aumento da liberação de glutamato em relação ao GABA em situações de despolarização neuronal. Observamos também uma diminuição nos ritmos corticais teta e gama com predomínio de ondas lentas, indicando uma alteração na sincronização da rede neuronal. A mudança no perfil de oscilações corticais pode muito bem estar associada às alterações neurológicas em AGI. Estes dados fornecem informações que podem ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos com a hiperexcitabilidade associada a AGI.

7.PERSPECTIVAS

- Uma vez que o estriado parece ser claramente afetado na AGI, pretendemos determinar as mudanças no padrão de liberação de glutamato e GABA no estriado por HPLC e pela avaliação do imunoconteúdo de vGLUT1, vGAT e GAD em sinaptossomas estriatais *por Western blot*;

- Como o imunoconteúdo da enzima GAD apresentou diminuição, pretendemos avaliar a atividade da GAD por HPLC no córtex e estriado para determinar uma possível disfunção que possa estar correlacionado com a diminuição dos níveis de GABA;

- Como observamos mudanças nos níveis dos neurotransmissores glutamato e GABA pretendemos analisar do ponto de vista eletrofisiológico as mudanças na transmissão sináptica inibitória e excitatória nas regiões do córtex e do estriado através da análise detalhada das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) e das correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) espontâneas e evocadas através de registros de *patch-clamp in vitro (voltage-clamp)* em neurônios corticais e estriatais.

Isto poderá nos proporcionar informações sobre mecanismos moleculares e eletrofisiológicos envolvidos na epileptogênese dos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis.

8.RESULTADOS PRELIMINARES

Temos como dados preliminares os resultados da análise inicial dos sinaptossomas estriatais dos animais (1) por HPLC, para avaliar a liberação de glutamato e GABA basal e após despolarização induzida por aumento de potássio; e (2) por *Western blot* para avaliar o imunoconteúdo dos transportadores vGLUT1 e vGAT.

Verificamos que nos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis tanto os níveis basais de glutamato quanto após a despolarização, foram significativamente menores que os grupos *Gcdh^{-/-}*-e controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas

comparações, $p < 0,05$) (Figura preliminar P1, A e B). Não houve diferença na porcentagem de liberação de glutamato após a despolarização entre os grupos (Figura preliminar P1, C). Os níveis de GABA, por sua vez, tanto basais como após a despolarização, apresentaram-se elevados nos animais *Gcdh*^{-/-} quando comparados aos grupos controle e *Gcdh*^{-/-}-Lis (Figura preliminar P1, D, E). Da mesma forma que o glutamato a porcentagem de liberação em relação ao basal foi semelhante para todos os grupos (Figura preliminar P1, F). Os dados detalhados são apresentados na tabela preliminar P1.

Tabela P1 – Liberação de glutamato e GABA em sinaptossomas estriatais dos diversos grupos de animais.

	Grupo	Liberação Basal ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$)	Liberação após despolarização	% de liberação após despolarização em relação ao basal
ESTRIADO	Glutamato			
	Controle	19288,95 \pm 2284,05 n=12	31598,18 \pm 1193,07 n=12	70,56 \pm 1797,54 n=12
	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	22385,53 \pm 3281,14 n=6	43671,54 \pm 3586,29 n=6	94,46 \pm 2729,89 n=6
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Lis	4006,87 \pm 11,44 n=4	12894,98 \pm 8,96 n=4	54,69 \pm 7,64 n=4
	GABA			
	Controle	5388,32 \pm 661,85 n=18	8915,18 \pm 960,11 n=18	74,22 \pm 9,72 n=18
	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	13483,05 \pm 809,08 n=10	20350,19 \pm 847,72 n=10	53,49 \pm 6,92 n=10
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Lis	5944,94 \pm 775,78 n=5	9918,31 \pm 1958,48 n=5	61,93 \pm 12,34 n=5

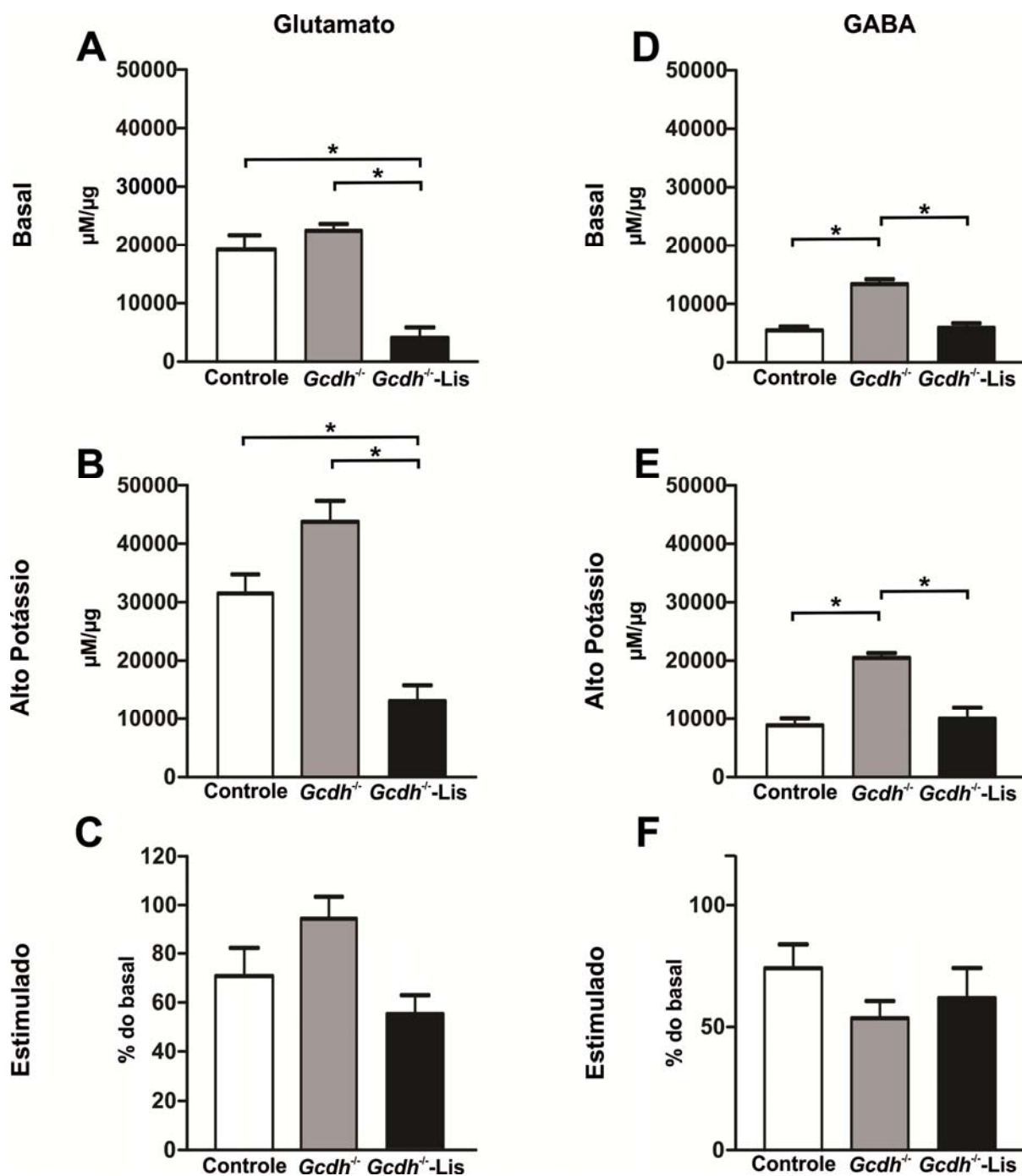


Figura P1 – Análise por HPLC mostra mudança na quantidade de liberação de glutamato e GABA em sinaptossoma estriatal. A: Liberação basal de glutamato. **B:** Liberação de glutamato após estimulação pela adição de alto potássio. **C:** Porcentagem de liberação de glutamato em relação ao basal. **D:** Liberação basal de GABA. **E:** Liberação de GABA após estimulação pela adição de alto potássio. **F:** Porcentagem de liberação de GABA em relação ao basal. (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações * $P < 0,05$).

O imunoconteúdo de vGLUT1 foi significativamente menor no grupo *Gcdh*^{-/-}-Lis (59,39±5,07, n=7) quando comparado ao grupo controle (100±8,64, n=9) (Figura preliminar P2, A). (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, p<0,05). Entretanto, não observamos diferença significativa no imunoconteúdo de vGAT entre os grupos (Figura preliminar P2, B). Não houve diferença na sinaptofisina, usadas como controle da quantidade de vesículas sinápticas (Figura preliminar P2, C). Nossos dados preliminares podem nos dar indícios do aumento da hiperexcitabilidade no estriado dos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis e experimentos nesta linha estão em andamento.

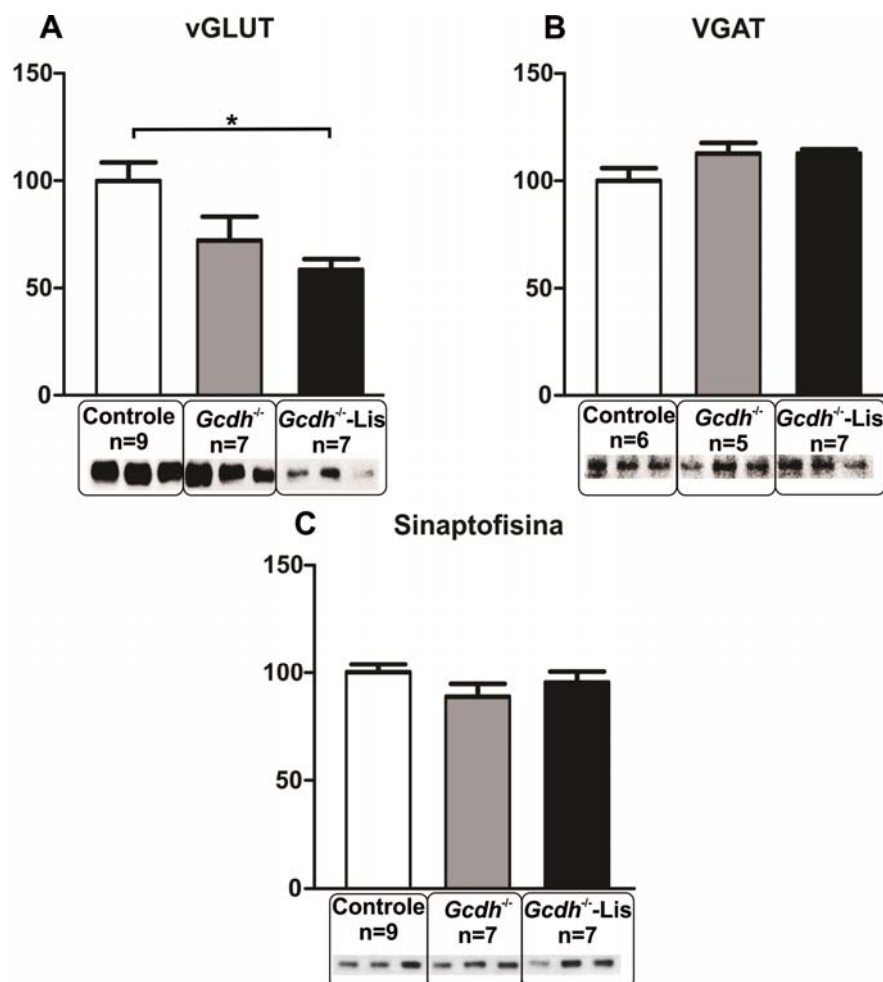


Figura P2 – Diminuição do transportado vesicular de glutamato em sinaptossomas estriatais quantificados por Western blot. A: Transportador vesicular de glutamato – vGLUT. **B:** Transportador vesicular de GABA – vGAT. **C:** Sinaptofisina. (ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações *P<0,05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIHARA, Y; MASHIMA, H; ONDA, H; HISANO, S; KASUYA, H; HORI, T; YAMADA, S; TOMURA, H; YAMADA, Y; INOUE, I; KOJIMA, I; TAKEDA, J. Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. **Journal of Neurochemistry**, 74, p. 2622-2625, 2000.

AMARAL, A. U; SEMINOTTI, B; CECATTO, C; FERNANDES, C. G; BUSANELLO, E. N. B; ZANATTA, Â; KIST L. W; BOGO, M. R; DE SOUZA, D. O. G; WOONTNER, M; GOODMAN, S; KOELLER, D. M; WAJNER, M. Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. **Molecular genetics and metabolism**, 107(3), p. 375-82, 2012.

AMIR, N; ELPELEG, O. N; SHALEY, R. S; CHRISTENSEN, E. Glutaric aciduria type I: enzymatic and neuroradiologic investigations of two kindreds. **Journal of Pediatrics**, 114, p. 983-989, 1989.

BALCAR, V.J; JOHNSTON, G.A.R; The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. **Journal of Neurochemistry**, 19 p. 2657–2662, 1972.

BARIĆ, I; ZSCHOCKE, J; CHRISTENSEN, E; DURAN, M; GOODMAN, S. I; LEONARD, JV; MULLER, E; MORTON, DH; SUPERTI-FURGA, A; HOFFMANN, GF. Diagnosis and management of glutaric aciduria type 1. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 21, p. 326–40, 1998.

BARIĆ, I; FUMIĆ, K; HOFFMANN, G. F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croatian Medical Journal**, 42(4), p.379-83, 2001.

BEAUCHAMP, MH; BONEH, A; ANDERSON, V. Cognitive, behavioural and adaptive profiles of children with glutaric aciduria type I detected through newborn screening. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 32(S1), p. 207-213, 2009.

BENNET, JP; LOGAN, W. J; SNYDER, S. H. Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. **Journal Neurochemistry**; 21, p. 1533–50, 1973.

BIERY, B.J.; STEIN, D.E.; MORTON, D.H., GOODMAN, S.I. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. **The America Journal of Human Genetics**, 59, p. 1006-1011, 1996.

BROMFIELD, E. B; CAVAZOS, J. E; SIRVEN, J. I. An Introduction to Epilepsy. eds.: West Hartford (CT): American Epilepsy Society, 2006.

BOULLAND, J. L; FERHAT, L; TALLAK SOLBU, T; FERRAND, N; CHAUDHRY, F. A; STORM-MATHISEN, J; ESCLAPEZ, M. Changes in vesicular transporters for gamma-aminobutyric acid and glutamate reveal vulnerability and reorganization of hippocampal neurons following pilocarpine-induced seizures. **Journal of Comparative Neurology**, 503(3), p. 466-85, 2007.

BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. **Neuron**, 33, p. 325–340, 2002.

CALCAGNOTTO, M. E; PAREDES, M. F; BARABAN, S. C. Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. **Journal of Neuroscience**, 22(17), p. 7596-605, 2002.

CALCAGNOTTO, M. E; BARABAN, S. C. Prolonged NMDA-mediated responses, altered ifenprodil sensitivity, and epileptiform-like events in the malformed

hippocampus of methylazoxymethanol exposed rats. **Jornal of Neurophysiology**, 94(1), p. 153-62, 2005a.

CALCAGNOTTO, M. E; PAREDES, M. F; TIHAN, T; BARBARO, N. M; BARABAN, S. C. Dysfunction of synaptic inhibition in epilepsy associated with focal cortical dysplasia. **Jornal of Neuroscience**, 25(42), p.9649-57, 2005b.

CHRISTENSEN, E. A fibroblast glutaryl-CoA dehydrogenase assay using detritiation of 3H-labelled glutaryl-CoA: application in the genotyping of the glutary- CoA dehydrogenase locus. **Clinica Chimica Acta**, 220, p. 71-80, 1993.

COBOS, I; CALCAGNOTTO, M. E; VILAYTHONG, A. J; THWIN, M. T; NOEBELS, J. L; BARABAN, S. C; RUBENSTEIN, J. L. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. **Nature Neuroscience**, 8(8), p.1059-68, 2005.

COSSART, R; BERNARD, C; BEN-ARI, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. **Trends Neuroscience**, 28, p. 108–115, 2005.

DIONISI-VICI, C; DEODATO, F; RASCHINGER, W; RHEAD, W; WILCKEN, B. Classical organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria, and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 29 (2–3), p. 383–389. 2006.

FLOTT-RAHMEL, B; FALTER, C; SCHLUT, R. Nerve cell lesions caused by 3OH-glutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidemia I? **Journal Inherited Metabolic Disease**, 20, p. 387-390, 1997.

FUNK, C.B; PRASAD, A. N; FROSK, P; SAUER, S; KÖLKER, S; GREENBERG, C. R; DEL BIGIO, M. R. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. **Brain**, 128, p. 711–722, 2005.

GARROD, ARCHIBALD E. The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality. **Lancet**, 2, p. 1616-1620, 1902.

GREENBERG, C.R; REIMER, D; SINGAL, R; TRIGGS-RAINE, B; CHUDLEY, A.E; DILLING, L.A; PHILIPPS, S; HAWORTH, J.C; SEARGEANT, L.E; GOODMAN, S.I. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl-CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. **Human Molecular Genetics**, 4, p. 493-495, 1995.

GOODMAN, S. I; MARKEY, S.P; MOE, P.G; MILES, B. S; TENG, C. C. Glutaric aciduria: a new disorder of aminoacid metabolism. **Biochemical Medicine**, 12, p.12-21, 1975.

GOODMAN, S. I; NOREMBERG, M. D; SHIKES, R. H; BRESLICH, D. J; MOE, P. G. Glutaric aciduria: biochemical and morphological considerations. **Journal of Pediatrics**, 90, p. 746-750, 1977.

GOODMAN, S.I; FRERMAN, F.E. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic academia and glutaric academia. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, p. 2195–2204, 1995.

HÄRTEL, U; ECKEL, E; KOCH, J; FUCHS, G; LINDER, D; BUCKEL, W. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. **Archives of Microbiology**, 159, p. 174-181, 1993.

HARTLEY, L. M; KHWAJA, O. S; VERITY, C. M. Glutaric aciduria type 1 and nonaccidental head injury. **Pediatrics**, 107, p. 174–5, 2001.

HAWORTH, J.C.; BOOTH, F.A.; CHUDLEY, A.E; DEGROOT, G. W; DILLING, L. A; GOODMAN, S.I; GREENBERG, C.R; MALLORY, C. J; MCCLARTY, B. M; SESHIA, S. S. Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. **Journal of Pediatrics**, 118, p. 52-58, 1991.

HERZOG, E; GILCHRIST, J; GRAS, C; MUZERELLE, A; RAVASSARD, P; GIROS, B; GASPAR, P; EL MESTIKAWY, S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. **Neuroscience**, 123, p. 983-1002, 2004.

HOFFMANN, G. F; GIBSON, K. M; TREFZ, F. K; NYHAN, W. L; BREMER, H. J; RATING, D. Neurological manifestations of organic acid disorders, **European Journal of Pediatrics**, 153. p. S94–S100, 1994.

HOFFMAN, P. L; IORIO, K.R; SNELL, L.D; TABAKOFF, B. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, 19, p. 721–726, 1995.

HOFFMANN, G.F; ATHANASSOPOULOS, S; BURLINA, A. B; DURAN, M; DE KLERK, J. B; LEHNERT, W; LEONARD, J. V; MONAVARI, A. A; MÜLLER, E; MUNTAU, A. C; NAUGHTEN, E. R; PLECKO-STARTING, B; SUPERTI-FURGA, A; ZSCHOCKE, J; CHRISTENSEN, E. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**, 27, p. 115-123, 1996.

HOFFMANN, G.F; ZSCHOCKE, J. Glutaric Aciduria Type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 22, p. 381-391, 1999.

JAFARI, P; BRAISSANT, O; BONAFÉ, L; BALLHAUSEN D. The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. **Molecular Genetics and Metabolism**, 104(4), p. 425-37, 2011.

JAMJOOM, Z. A. B; OKAMOTO, E; AL-HAJERY, O; ABU-MELHA, A. Bilateral arachnoid cysts of the sylvian region in female siblings with glutaric aciduria type I. **Journal of Neurosurgery**, 82, p. 1078-1081, 1995.

KOELLER, D. M; WOONTNER, M; CRNIC, L. S; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B; STEPHENS, J; HUNT, E. L; GOODMAN, S. I. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Human Molecular Genetics**, 11(4), p. 347-57, 2002.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 22, p. 259–262, 1999.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro. **Amino Acids**. 18, p. 31–40, 2000a.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatrics Research**, 47, p. 495–503, 2000b.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Evaluation of trigger factors of acute ancephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor alpha. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 23, p. 359-362, 2000c.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neuro- toxicity in primary neuronal

cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatrics Research**, 50, p. 76–82, 2001a.

KÖLKER, S; KÖHR, G; AHLEMEYER, B; OKUN, J.G; PAWLAK, V; HORSTER, F; MAYATEPEK, E; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatrics Research**, 52 (2), p. 199–206, 2002a.

KÖLKER, S; OKUN, J.G; AHLEMEYER, B; WYSE, A.T; HORSTER, F; WAJNER, M; KOHLMULLER, D., MAYATEPEK, E; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Journal of Neuroscience Research**, 685, p. 424–431, 2002b.

KÖLKER, S; KOELLER, D.M; OKUN, J.G; HOFFMANN, G.F. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Annals of Neurology**, 55 (1), p. 7–12, 2004.

KÖLKER, S; GARBADE, S; GREENBERG, C. R. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatrics Research**, 59, p.840–847, 2006.

KYLLERMAN, M; SKJELDAL, O; CHRISTENSEN, E; HAGBERG, G; HOLME, E; LONNQUIST, T; SKOV, L; ROTWELT, T; VON DOBELN, U. Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type I. **European Journal of Pediatrics Neurology**, 8, p. 121-129, 2004.

LAMAS, M; GÓMEZ-LIRA, G; GUTIÉRREZ R. Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. **Brain Research Molecular Brain Research**, 93(2), p. 209-14, 2001.

LATINI, A; BORBAROSA, R; SCUSSIATO, K; LLESUY, S; BELLO-KLEIN, A; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **Brain Research** 956 (2), p. 367–373, 2002.

LIESERT, M; ZCHOCKE, J; HOFFMANN, G. F; MUHLHAUSER, N; BUCKEL, W. Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 22, p. 256-258, 1999.

LIMA, T. T; BEGNINI, J; DE BASTIANI, J; FIALHO, D. B; JURACH, A; RIBEIRO, M. C; WAJNER, M; DE MELLO, C. F. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. **Brain Research**, 802(1-2), p. 55-60, 1998.

LINDNER, M; KÖLKER, S; SCHULZE, A; CHRISTENSEN, E; GREENBERG, C. R; HOFFMANN, G. F. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 27, p. 851–859, 2004.

MAGNI, D. V; BRÜNING, C. A; GAI, B. M; QUINES, C. B; ROSA, S. G; FIGHERA, M. R; NOGUEIRA, C. W. m-Trifluoromethyl diphenyl diselenide attenuates glutaric acid-induced seizures and oxidative stress in rat pups: involvement of the γ -aminobutyric acidergic system. **Journal of Neuroscience Research**, 93 (9), p. 1723-31, 2012.

MELLO DE, C.F; KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; DE SOUZA, F.R; FIGHERA, M.R; MAYATEPEK, E; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, G.F; WAJNER, M. Intrastratial administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. **Brain Research**, 916, p. 70–75, 2001.

MERINERO, B; PÉREZ-CERDA, C; FONT, L. M. Variable clinical and biochemical presentation of seven spanish cases with glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**, 26, p. 238-242, 1995.

MORIMOTO, K; FAHNESTOCK, M; RACINE, R. J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, 73, p. 1–60, 2004.

NASREEN, Z; JAMEEL, T; HASAN, A; PARVEEN, N; SADASIVUDU, B. Glutamate decarboxylase and GABA aminotransferase levels in different regions of rat brain on the onset of Leptazol induced convulsions. **Neurochemistry Research**, 37(1), p. 202-4, 2012.

PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. compact 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: **Elsevier Academic Press**, 2004.

PÖGE, A. P; AUTSCHBACH, F; KORALL, H; TREFZ, F. K; MAYATEPEK E. Early clinicalmanifestation of glutaric aciduria type I and nephrotic syndrome during the firstmonths of life. **Acta of Pediatrics**, 86, p. 1144–47, 1997.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalographic and Clinical Neurophysiology**, 32(3), p. 281-94, 1972.

ROSA, R. B; SCHWARZBOLD, C; DALCIN, K. B; GHISLENI, G. C; RIBEIRO, C. A; MORETTO, M. B; FRIZZO, M. E; HOFFMANN, G. F; SOUZA, D.O; WAJNER, M. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. **Neurochemistry International**, 45 (7), p. 1087–1094, 2004.

ROSA, R. B; DALCIN, K. B; SCHMIDT, A. L; GERHARDT, D; RIBEIRO, C. J; FERREIRA, G. C; SCHUCK, P. F; WYSE, A. T S; PORCIÚNCULA, L. O;

WOFCHUK, S; SALBEGO, C. G; SOUZA, D. O; WAJNER, MOACIR. Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. **Life sciences**, 81, p. 1668-76, 2007.

SCRIVER, C. R; BEAUDET, A. L; SLY, W. S; VALLE, D. (Eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8.ed, p. 1971-2001.

SEASHORE, M. R. The Organic Acidemias: An Overview. **Medicine** 1-53 .at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=oa-overview>. 2009

STOKKE, O; GOODMAN, S. I; MOE, P. G. Inhibition of brain glutamatedecarboxylase by glutarate, glutaconate and b-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria. **Clinica Chimica Acta**, 16, p. 411–515, 1976.

STRAUSS, K. A; PUFFENBERGER, E. G; ROBINSON, D. L; MORTON, D. H. Type I glutaric aciduria, part I: natural history of 77 patients. **American Journal of Medical Genetics**, 121, p. 38-52, 2003.

TORTORELLI, S; HAHN, S. H; COWAN, T. M; BREWSTER, T. G; RINALDO, P; MATERN, D. The urinary excretion of glutaryl carnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. **Molecular Genetics and Metabolism**, 84(2), p.137-43, 2005.

VAN DER HEL, W. S; VERLINDE, S. A; MEIJE, R D. H; DE WIT, M; RENSEN, M. G; VAN GASSEN, K. L; VAN RIJEN, P. C; VAN VEELLEN, C. W; DE GRAAN, P. N. Hippocampal distribution of vesicular glutamate transporter 1 in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, 50(7), p. 1717-28,2009.

WAJNER, M; RAYMOND, K; BARSCHAK, A; LUFT, A; FERREIRA, G; DOMINGUES, G; CHIOCHETTA, M; SIRTORI, L; GOULART, L; PULROLNIK, V;

SANSEVERINO, M. T. Detection of Organic Acidemias in Brazil. **Archives of Medical Research**, 33(6), p. 581-585, 2001.

WAJNER, M; KÖLKER, S; SOUZA, D. O; HOFFMANN, G. F; MELLO, C.F. Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 27(6), p. 825–828, 2004.

WANG, Y; ZHAN, L; ZENG, W; LI, K; SUN, W; XU, Z. C; XU, E. Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. **Neurochemistry Research**, 36(12), p. 2409-16, 2011.

TELLEZ-ZENTENO, J. F, HERNÁNDEZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research and Treatment**, p. 1-5, 2012.

ZINNANTI, W. J; LAZOVIC, J; WOLPERT, E. B; ANTONETTI, D. A; SMITH, M. B; CONNOR, J. R; WOONTNER, M; GOODMAN, S. I; CHENG, K. C. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain**, 129(Pt 4), p. 899-910, 2006.

ZSCHOCKE, J; QUAK, E; GULDBERG, P; HOFFMANN, G.F. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. **Journal of Medical Genetics**, 37, p. 177-181, 2000.

ANEXO 1 – Script/ MATLAB usado na análise dos dados

```
%% slicing
subplot(2,1,1)
plot(AD07)
ylim([-2 2])

subplot(2,1,2)
pedaco=AD07([300000:600000],:);
plot(pedaco)
%%
srate=1000;
window = 2*srate;
noverlap = window/2;
nfft = [];
fs = srate;
[S, F, T,P]=spectrogram(pedaco,window,noverlap,nfft,fs);

%% frequency decomposition
I_theta = find(F>1 & F<4);
thetapow(1) = sum(sum(P(I_theta,:)))/length(T);

I_theta = find(F>4 & F<10) ;
thetapow(2) = sum(sum(P(I_theta,:)))/length(T);

I_theta = find(F>20 & F<50) ;
thetapow(3) = sum(sum(P(I_theta,:)))/length(T);

thetapow
bar(thetapow)
set(gca,'Xlim', [0 length(thetapow)+1])

%% plotting
dt=1/srate;
timevec = dt:dt:length(pedaco)/srate;
[S, F, T, P] = spectrogram(detrend(pedaco),window,noverlap,nfft,fs);

subplot(2,1,1)
imagesc(T,F,(P))
colorbar
axis xy
caxis([0 0.002])
ylim([0 50])
subplot(2,1,2)
plot(timevec,pedaco,'k')
```