

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

**ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE
DO ÓLEO DE PEIXE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristina Ruedell Reschke Banderó

Santa Maria, RS, Brasil

2010

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DO ÓLEO DE PEIXE

por

Cristina Ruedell Reschke Banderó

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

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

**ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE
DO ÓLEO DE PEIXE**

elaborada por
Cristina Ruedell Reschke Banderó

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (UFSM)
(Presidente/ Orientador)

Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian (UNIPAMPA)

Prof^a Dr^a Tatiana Emanuelli (UFSM)

Santa Maria, 18 de agosto de 2010

“Concedei-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras”.

Oração da Serenidade

Dedicatória

À minha família,
em especial ao meu avô,
Affonso Ruedell (*in memoriam*),
quem me ensinou que o estudo é
o alimento da mente.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida fazendo-me persistir aos desafios.

Aos meus pais, Urbano e Lia, que me conduziram desde os primeiros passos, incentivando e apoiando minhas escolhas, com amor incondicional.

Ao meu amor Vilmar, agradeço pelo companheirismo, apoio, incentivo, dedicação, paciência em todos os momentos e, principalmente, pelo amor e pelos sonhos compartilhados.

Ao meu irmão Rafael, por torcer sempre pelo meu sucesso, pelo exemplo de superação e por me ensinar o sentido da força e fé. À minha irmã Bruna, pela confiança, carinho e amor transmitido a cada dia. Amo muito vocês!

A toda família Banderó, em especial à D. Nilva, que foram presença constante nesta conquista.

Ao meu orientador, professor Carlos Mello, pelos ensinamentos que possibilitaram meu crescimento científico, pela confiança, por acolher-me no seu grupo de pesquisa.

A todos os colegas e amigos do LABNEURO agradeço pela disponibilidade, pela dedicação e por tornarem o meu dia-a-dia um constante aprendizado e divertimento. Em especial às amigas Quéli, Mirian, Anajara.

Aos professores e amigos Mauro e Ana pelas preciosas sugestões e ensinamentos. Obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

À Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar a qualificação através da sua pós-graduação.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

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

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DO ÓLEO DE PEIXE

Autora: Cristina Ruedell Reschke Banderó
Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 18 de agosto de 2010.

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo caracterizado pelo acúmulo tecidual de ácido metilmalônico (MMA) e disfunção neurológica, incluindo convulsões. Os ácidos graxos dietéticos são conhecidos como fonte de energia e reduzem a atividade convulsivante em determinados modelos experimentais agudos de convulsão. Este estudo investiga se o tratamento crônico com óleo de peixe ou com ácido oléico atenua as convulsões induzidas por MMA. Ratos Wistar machos adultos foram tratados com óleo de peixe (85 mg / kg), ácido oléico (85 mg / kg) ou veículo (solução aquosa de Cremophor EL[®] 0,42%, 4 mL / kg de peso corporal / dia), via oral, por 75 dias. No 73º dia foi implantada uma cânula no ventrículo lateral direito e dois eletrodos sobre o córtex parietal para o registro eletroencefalográfico. No 76º dia metade dos animais de cada grupo foi injetada com NaCl (2,5 µmol / 2,5 µL, i.c.v.), e outra metade com MMA (2,5 µmol / 2,5 µL, i.c.v.), e a atividade convulsiva foi medida por EEG e monitoramento comportamental concomitantemente. O efeito da prostaglandina E₂ (PGE₂) na atividade Na⁺, K⁺-ATPase foi determinada em fatias de córtex cerebral dos animais injetados com NaCl (controle). A administração de óleo de peixe aumentou a latência para as convulsões tônico-clônicas induzidas por MMA e reduziu a amplitude média dos registros ictais de EEG. O ácido oléico diminuiu a amplitude média dos registros ictais de EEG. O tratamento com óleo de peixe preveniu a diminuição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase induzida por PGE₂ em fatias corticais *in vitro*. Os resultados suportam um papel importante anticonvulsivante do óleo de peixe sobre as convulsões induzidas por MMA. A prevenção da redução da Na⁺, K⁺-ATPase induzida por PGE₂ nos animais tratados com óleo de peixe pode estar relacionada à sua atividade anticonvulsivante atualmente relatada.

Palavras-chave: Metilmalonato, convulsão, inflamação, ácidos graxos

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTICONVULSANT ACTIVITY OF FISH OIL

Author: Cristina Ruedell Reschke Banderó
Advisor: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-advisor: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira
Date and place of the defense: Santa Maria, August 18th, 2010.

Methylmalonic acidemias are inherited metabolic disorders characterized by methylmalonate (MMA) accumulation and neurological dysfunction, including seizures. Dietary fatty acids are known as an important energy source and reduce seizure activity in selected acute animal models. This study investigates whether the chronic treatment with fish oil or with oleic acid attenuates MMA-induced seizures. Adult male Wistar rats were treated with fish oil (85 mg/kg), oleic acid (85 mg/kg) or vehicle (0.42 % aqueous Cremophor EL™, 4 mL/kg/body weight/day), p.o., for 75 days. In the 73th day were implanted a cannula in the right lateral ventricle with electrodes over the parietal cortex for EEG recording. In the 76th day half the animals from each group were injected with NaCl (2.5 μmol/2.5 μL, i.c.v.), and the other half with MMA (2.5 μmol/2.5 μL, i.c.v.), and seizure activity was measured by EEG recording with concomitant behavior monitoring. The effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) on Na⁺,K⁺-ATPase activity of slices of cerebral cortex from NaCl-injected (control) animals was determined. Fish oil administration increased the latency for MMA-induced tonic-clonic seizures and reduced the mean amplitude of ictal EEG recordings. Oleic acid decreased mean amplitude of ictal EEG recordings. Treatment with fish oil prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in cortical slices *in vitro*. The results support a major anticonvulsant role for fish oil against MMA-induced seizures. The decreased sensitivity of Na⁺,K⁺-ATPase from fish oil-treated animals to the inhibitory effect of PGE₂ may be related to its currently reported anticonvulsant activity.

Key words: methylmalonate, seizure, fatty acid, fish oil, oleic acid

LISTA DE FIGURAS

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Acidemia metilmalônica

FIGURA 1 – Metabolismo do L-metilmalonil-CoA 22

FIGURA 2 – Modelo da falência energética induzida pelo metilmalato 27

3.2 Ácidos graxos (AG)

FIGURA 3 – Estrutura tridimensional de um quilomícron (QM) 29

FIGURA 4 – Mecanismos de regulação da síntese de ácidos graxos (AG) 31

FIGURA 5 – Formação do ácido oléico 32

FIGURA 6 – Mecanismo hormônio-sensível de liberação dos AG 33

FIGURA 7 – Estrutura química dos ácidos graxos precursores (18 C) das famílias n-3, n-6 e n-9 34

FIGURA 8 – Vias metabólicas das famílias n-3, n-6 e n-9 35

FIGURA 9 – Biossíntese de eicosanóides a partir de AGPI 37

FIGURA 10 – Convergência das vias metabólicas do EPA, AA e ETA 41

FIGURA 11 – Esquema de funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase 46

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito

FIGURE 1 – The chronic treatment with fish oil (4mL/Kg, p.o.) did not alter the latency for myoclonic jerks (A), and increased the latency for the tonic-clonic seizures (B) of convulsive episodes MMA-induced (2.5 $\mu\text{mol}/2.5 \mu\text{L}$, i.c.v.) 63

FIGURE 2 – Representative electroencephalographic recordings from the parietal cortex (CTX) of animals that received vehicle (A-B), fish oil (C-D) or oleic acid (E-F), showing that fish oil (D) increased latency for seizures and reduced mean amplitude of ictal events. Oleic acid (F) reduced mean amplitude of ictal events. Black and white arrows indicate MMA injection and beginning of seizures, respectively 64

FIGURE 3 – Effect of fish oil and oleic acid (4mL/Kg, p.o.) on the mean amplitude of EEG recordings in the parietal cortex of animal injected with MMA (2.5 μ mol/2.5 μ L, i.c.v.) 65

FIGURE 4 – Fish oil prevents PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in cortical slices. Data are presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for *n* = 8 in each group. * Indicates a significant difference compared with the control group (*P* < 0.05) 66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA – ácido araquidônico
- ACC – acetil-CoA carboxilase
- AG – ácidos graxos
- AGE – ácidos graxos essenciais
- AGL – ácidos graxos livres
- AGPI – ácidos graxos poli-insaturados
- ALA – ácido α -linolênico
- AMPA – α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMPc – adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA – análise de variância
- AO – ácido oléico
- Apo C-II e Apo C-III – apolipoproteínas C-II e C-III
- ATP – trifosfato de adenosina
- BHE – barreira hematoencefálica
- Ca²⁺ – cálcio
- CAT-I – carnitina acil-transferase - I
- CO₂ – dióxido de carbono
- COX – ciclooxigenase
- DHA – ácido docosahexaenóico
- EEG – eletroencefalograma
- EPA – ácido eicosapentaenóico
- EP1, EP2, EP3 e EP4 – receptores para prostaglandina E₂, tipo 1, 2, 3 e 4
- ERO – espécie reativa de oxigênio
- ETA (n-9) – ácido 5, 8, 11-eicosatrienóico (ácido “Mead”)
- FADH₂ – flavina adenina dinucleotídio
- GABA – ácido γ -aminobutírico
- HDL – lipoproteína de alta densidade
- H₂O – água
- i.c.v. – intracerebroventricular
- IDL – lipoproteína de densidade intermediária
- IL-1 β – interleucina 1 β
- K⁺ – potássio
- KDa – kilodalton
- Kg – kilograma

AL – ácido linoléico
LCR – líquido cefalorraquidiano
LDH – lactato desidrogenase
LDL – lipoproteína de baixa densidade
L-NAME – Metil éster de N^W –nitro-L-arginina
LOX – lipooxigenase
LT – leucotrieno
mg – miligrama
Mg²⁺ – magnésio
MK-801 – dizocilpina
MMA – ácido metilmalônico ou metilmalonato
Na⁺ – sódio
NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NFkB – fator de transcrição nuclear kappa B
NH₃ – amônia
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
n-3, n-6 e n-9 – séries ou famílias ômega 3, 6 e 9
PEPS – potencial excitatório pós-sináptico
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}
PGG₂ – prostaglandina G₂
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGHS – prostaglandina H₂ sintase
PGI₂ – prostaciclina
PG – prostaglandina
pH – potencial hidrogeniônico
PIPS – potencial inibitório pós-sináptico
PKC – proteína quinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLA_{2c} – fosfolipase A₂ citosólica
PLA_{2s} – fosfolipase A₂ secretada
PLA_{2i} – fosfolipase A₂ citosólica independente de Ca²⁺
PLC – fosfolipase C
PTZ – pentilenotetrazol

QM – quilomícrons
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
SDH – succinato desidrogenase
SNC – sistema nervoso central
TG – triglicéridios
TNF- α – fator de necrose tumoral α
TX – tromboxano
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade
v.o. – via oral
 ω – ômega
 μL – microlitro
 γ -GT – γ -glutamil transferase
3-NP – 3-nitropropionato
5-HPETE – ácido 5-hidroxiperoxieicosatetraenóico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Acidemia Metilmalônica	22
3.1.1 Fisiopatologia	22
3.1.2 Manifestações Clínicas	23
3.1.3 Efeito convulsivante do MMA e os receptores NMDA	24
3.2 Ácidos graxos (AG)	28
3.2.1 Absorção e transporte.....	28
3.2.2 Metabolismo	30
3.2.3 AG dietéticos	33
3.2.4 Conversão a eicosanóides	36
3.3 Inflamação, convulsões e ácidos graxos (AG)	39
3.3.1 O processo inflamatório	39
3.3.2 Mecanismo putativo das convulsões	42
3.3.3 Aspectos fisiológicos e funcionamento da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	45
3.3.4 Efeitos biológicos dos ácidos graxos (AG)	47
4 CAPÍTULO	49
4.1. Manuscrito	50
5 DISCUSSÃO	73

6 CONCLUSÕES	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **CAPÍTULO**. Nesse item, está o manuscrito do artigo, submetido para a publicação. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliográficas**, encontram-se no capítulo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo “acidemias orgânicas clássicas” convencionalmente define três diferentes tipos de doenças hereditárias: acidemias isovalérica, propiônica e metilmalônica (Ogier de Baulny & Saudubray, 2002). Destas, a propiônica e a metilmalônica são as mais frequentes, com manifestações de forma súbita e potencialmente letais (Wajner et al., 2001).

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo, autossômico recessivo, caracterizado pelo acúmulo de ácido metilmalônico (MMA). Este acúmulo deve-se à inibição ou pouca atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase (MCM, E.C. 5.4.99.2), dependente de vitamina B₁₂ e responsável pela conversão do L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA na rota da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar e do propionato (Fenton, 2001).

As manifestações clínicas desta doença ocorrem normalmente na primeira semana de vida, e são predominantemente neurológicas. Assim os pacientes afetados apresentam encefalopatia, hipotonia, retardo mental e psicomotor, alterações comportamentais e neuropsiquiátricas, atrofia cerebral, anormalidades no registro eletroencefalográfico (EEG), coma e convulsões (Hoffmann et al., 1993, Cornejo et al., 2003). Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade em que se instala o distúrbio metabólico (Ogier de Baulny, 2002).

Os tratamentos atualmente disponíveis para acidemia metilmalônica, basicamente dietéticos, não são completamente eficazes na prevenção das manifestações clínicas. Neste contexto, torna-se importante a busca por novas terapias com o objetivo de auxiliar no tratamento desta patologia.

Os ácidos graxos (AG) são tradicionalmente conhecidos como fonte de energia e, atualmente, reconhecidos pela sua importância no desenvolvimento neuronal. Um desequilíbrio no aporte dietético destes AG pode contribuir para anormalidades no neurodesenvolvimento infantil e para o desencadeamento de doenças neuropsiquiátricas em adultos (Richardson & Montgomery, 2005). Estudos

sugerem que a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 exerça efeito neuroprotetor (Coluccia et al., 2009), inclusive na prevenção de crises convulsivas em pacientes epiléticos (Schlanger et al., 2002, Yuen et al., 2005). No entanto, também há evidências de que esta suplementação não melhora o controle destas crises (Bromfield et al., 2008). Embora seja difícil determinar as razões para tais discrepâncias, há diferenças metodológicas importantes nestes estudos como: o tipo e a duração do tratamento, doses, vias de administração, e desenho experimental utilizado (Taha et al., 2009a).

Desta forma, é relevante a avaliação do efeito dos AG sobre as convulsões induzidas por MMA, com o objetivo de determinar novas alternativas terapêuticas para o tratamento da acidemia metilmalônica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento crônico com ácidos graxos sobre as convulsões induzidas por metilmalonato em ratos.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do tratamento crônico com óleo de peixe e ácido oléico sobre a latência e as alterações eletroencefalográficas características dos episódios convulsivos induzidos pela injeção de MMA em ratos.
2. Investigar o efeito do tratamento crônico com óleo de peixe e ácido oléico sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em ratos *ex vivo*.
3. Avaliar o efeito do tratamento crônico com óleo de peixe e ácido oléico sobre a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela incubação com PGE_2 em ratos *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Acidemia metilmalônica

3.1.1 Fisiopatologia

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo, autossômico recessivo, caracterizado por um acúmulo tecidual de L-metilmalonil-CoA que, por tiólise espontânea, transforma-se em ácido metilmalônico (MMA). Este acúmulo deve-se à inibição ou pouca atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2), uma proteína com 150 KDa, dependente de vitamina B₁₂, encontrada na matriz mitocondrial. A MCM é responsável pela conversão do metilmalonil-CoA em succinil-CoA na rota da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar e do propionato (Fenton, 1995), conforme mostrado na Figura 1. Além do MMA, também ocorre o acúmulo de metabólitos secundários como propionato, metilcitrato, β -OH-propionato e cetonas de cadeia longa (Fenton, 1995).

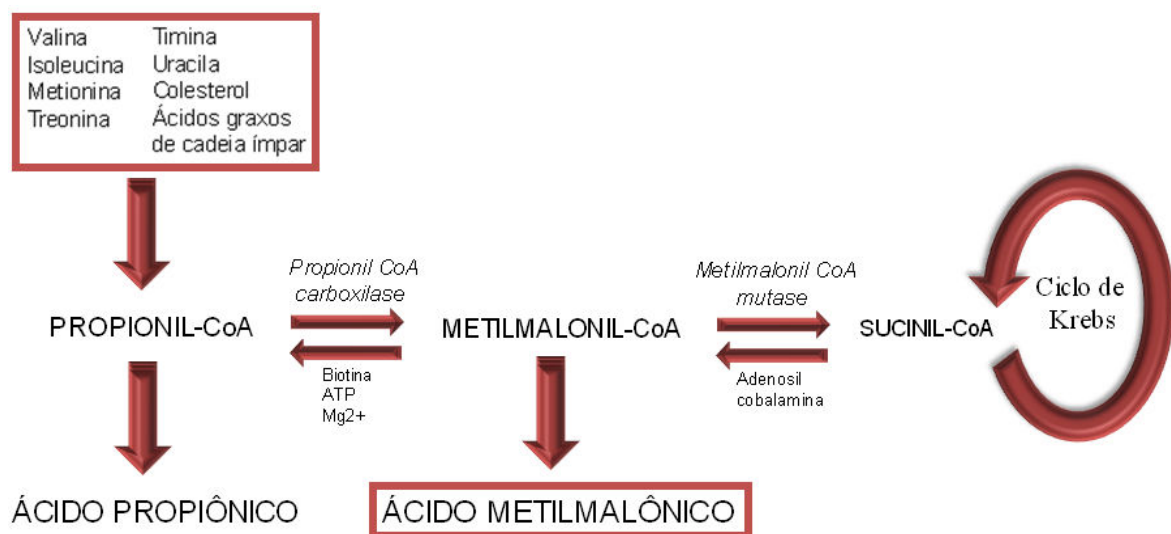


Figura 1 - Metabolismo do L-metilmalonil-CoA. Fonte: modificado de Fenton & Rosemberg, 1995.

3.1.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da acidemia metilmalônica ocorrem geralmente nas primeiras semanas de vida, com a instalação da cetoacidose. Aproximadamente 15 % das crianças sobrevivem, apresentando retardo mental e psicomotor, alterações neuropsiquiátricas (Dutra et al., 1993), anormalidades no eletroencefalograma (EEG) e convulsões (Hoffmann et al., 1993, Cornejo et al., 2003). O prognóstico da acidemia é melhor quando o quadro cetoacidótico se instala tardiamente (2 a 24 meses de vida), podendo haver ausência de alterações metabólicas e de comprometimento neurológico (van der Meer et al., 1994). Oberholzer et al. (1967) foram os primeiros a descrever a acidemia metilmalônica, através da observação de quantidades elevadas de ácido metilmalônico (MMA) no sangue e na urina de crianças em cetoacidose.

O acúmulo do MMA pode gerar acidose metabólica, hipoglicemia, hipercetonemia, hiperglicinemia, hiperamonemia, neutropenia, trombocitopenia e deficiência na síntese de ácidos graxos (AG) (Fenton, 2001). A hipoglicemia se deve ao comprometimento da gliconeogênese hepática pela inibição da enzima piruvato carboxilase pelo metilmalonil-CoA (Utter et al., 1970) e pela inibição do transporte mitocondrial de malato pelo MMA (Halperin et al., 1971). A hipercetonemia parece estar relacionada a duas causas: (1) elevada utilização de AG pela incapacidade de manutenção da glicemia (Oberholzer et al., 1967); (2) inibição da atividade das enzimas citrato sintetase, aconitase e isocitrato desidrogenase pelo metilcitrato, um dos metabólitos secundários acumulados na acidemia metilmalônica (Ando, 1971; Cheema-Dhadli, 1975). Outros compostos que também se encontram em concentrações elevadas, como o tiglato e a isoleucina, são responsáveis pela inibição da enzima que cliva a glicina em CO_2 e NH_3 , sendo uma das prováveis causas para a hiperglicinemia (Hillman & Otto, 1974).

Segundo Coude et al. (1979) e Glasgow & Chase (1976), o propionil-CoA, um metabólito importante acumulado na acidemia metilmalônica, inibe competitivamente a síntese de N-acetilglutamato a partir de acetil-CoA. O N-acetilglutamato, por sua vez, é um ativador alostérico da carbamil fosfato sintetase, a enzima responsável

pelo primeiro passo do ciclo da uréia. Um bloqueio neste ciclo resulta em acúmulo de amônia justificando a hiperamonemia apresentada por aproximadamente 70 % destes pacientes (Fenton et al., 1995). Além disso, a própria inibição da carbamil fosfato sintetase por ésteres de CoA pode causar hiperamonemia (Fenton et al., 1995). No entanto, Stewart & Walser (1980) postularam que a causa da hiperamonemia era mais complexa, uma vez que o aumento verificado nos níveis de aspartato e citrulina sugere que o MMA possa exercer efeito inibitório sobre a argininosuccinato sintetase em ratos.

O MMA inibe competitivamente, em vários tecidos, a enzima β -OH-butirato desidrogenase, responsável pela conversão de β -OH-butirato em acetoacetato. Como esta é a reação inicial da síntese de AG, ocorre uma diminuição na disponibilidade de carbonos para este fim (Patel & Owen, 1976; Dutra et al., 1993).

O metilmalonil-CoA é incorporado nas porções terminais dos AG, inibindo a incorporação de acetil-CoA e malonil-CoA nestas moléculas, segundo mostrou Cardinale (1970), em ratos. A incorporação de metilmalonil-CoA resulta em alterações estruturais nestes AG, o que compromete o funcionamento celular. Já Frankel et al. (1973) observaram que o metilmalonil-CoA inibe as atividades da acetil-CoA carboxilase e da sintetase de AG em fígado e sistema nervoso de ratos deficientes em vitamina B₁₂ relacionando, assim, a diminuição na síntese de AG ao acúmulo dos diferentes metabólitos comuns na acidemia metilmalônica.

3.1.3 Efeito convulsivante do MMA e os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)

Estudos têm demonstrado que o acúmulo de MMA inibe competitivamente a succinato desidrogenase (SDH) e a β -OH-butirato desidrogenase cerebral *in vitro* (Dutra et al., 1993). Wajner et al. (1992) observaram que o MMA reduz a produção de CO₂ e aumenta a produção de ácido láctico no cérebro, o que, segundo Siesjo (1981), pode contribuir para o dano cerebral por acidose grave, com valores de pH próximo a 6,0. A diminuição do pH intracelular é capaz de inibir, mesmo com níveis normais de adenosina trifosfato (ATP), a recaptação de glutamato pela glia e, assim, contribuir para o dano neuronal excitotóxico (Swanson et al., 1995). Pacientes com

acidemia metilmalônica ou propiônica, em acidose, apresentam uma redução de até 70 % da atividade da enzima citocromo oxidase (Hayasaka et al., 1982). Desta forma, o MMA pode causar interferência no metabolismo aeróbico celular, com a uma diminuição na produção de ATP.

A inibição da SDH e conseqüente redução de ATP levam à despolarização celular pela falência das várias ATPases mantenedoras dos gradientes iônicos através das membranas celulares, principalmente da Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) (Nathanson et al., 1995, Malfatti et al., 2003). A despolarização da membrana leva à saída do Mg⁺⁺ que bloqueia, de maneira voltagem-dependente, o canal do receptor glutamatérgico do subtipo NMDA, e permite a entrada de Ca⁺⁺ e de Na⁺ (em menor grau) para o meio intracelular (McDonald & Schoepp, 1993). O aumento na concentração de Ca⁺⁺ intracelular leva à ativação de enzimas dependentes deste íon envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, incluindo calpaína (Brorson et al., 1995), fosfolipase C (Umemura et al., 1992), proteína quinase C (Rothman, 1992; Pavlakovic et al., 1995), calcineurina (Armstrong, 1989; Snyder, 1995) e a óxido nítrico sintetase (Snyder, 1992), bem como a liberação de neurotransmissores armazenados em vesículas, inclusive do glutamato, de maneira dependente de cálcio. O aumento na concentração de potássio no meio extracelular também contribui para o aumento do glutamato extracelular pela inibição e/ou reversão dos transportadores de glutamato na pré-sinapse e na glia (Madl & Burgesser, 1993). A seqüência dos fenômenos celulares descritos acima é visualizada na Figura 2.

Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular por mecanismos glutamatérgicos relacionados ao receptor subtipo NMDA, como 3-nitropropionato (3-NP), malonato, rotenona, cianeto e oxi-aminoacetato. O 3-NP e o malonato, assim como o MMA, são inibidores da SDH (McDonald & Schoepp, 1993, Brouillet et al., 1994, Behrens et al., 1995, Pavlakovic et al., 1995). O padrão das lesões no SNC causadas pela administração sistêmica do 3-NP, em ratos, e pela intoxicação acidental em humanos é, morfológicamente, semelhante àquelas observadas em pacientes portadores da acidemia metilmalônica, em relação ao comprometimento seletivo dos núcleos da base como o caudado e putâmen (Ludolph et al., 1991; Beal et al., 1993; Fenton & Rosenberg, 1995).

A administração intra-estriatal de MMA induz convulsões em ratos adultos, que são inibidas por MK-801(antagonista dos receptores NMDA) e atenuadas por succinato. Desta forma, foi possível sugerir o envolvimento de receptores NMDA (de

Mello et al., 1996, Royes et al., 2006) e da inibição da SDH nestes episódios convulsivos (de Mello et al., 1996). Agonistas GABA_A e GABA_B também atenuam as convulsões induzidas por este ácido orgânico, mostrando que mecanismos GABAérgicos, particularmente a inibição da glutamato descarboxilase, contribuem para a excitabilidade aumentada induzida por MMA (Malfatti et al., 2007). Além disso, antioxidantes, como α -tocoferol, ácido ascórbico e gangliosídeo GM1 (Figuera et al., 1999, Figuera et al., 2003) atenuam, e agentes pró-oxidantes, como amônia (Marisco et al., 2003), facilitam as convulsões induzidas por MMA. Assim, tem sido sugerido o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) nestas convulsões (Royes et al., 2007), principalmente pela redução da capacidade antioxidante total verificada no SNC (Fontella et al., 2000).

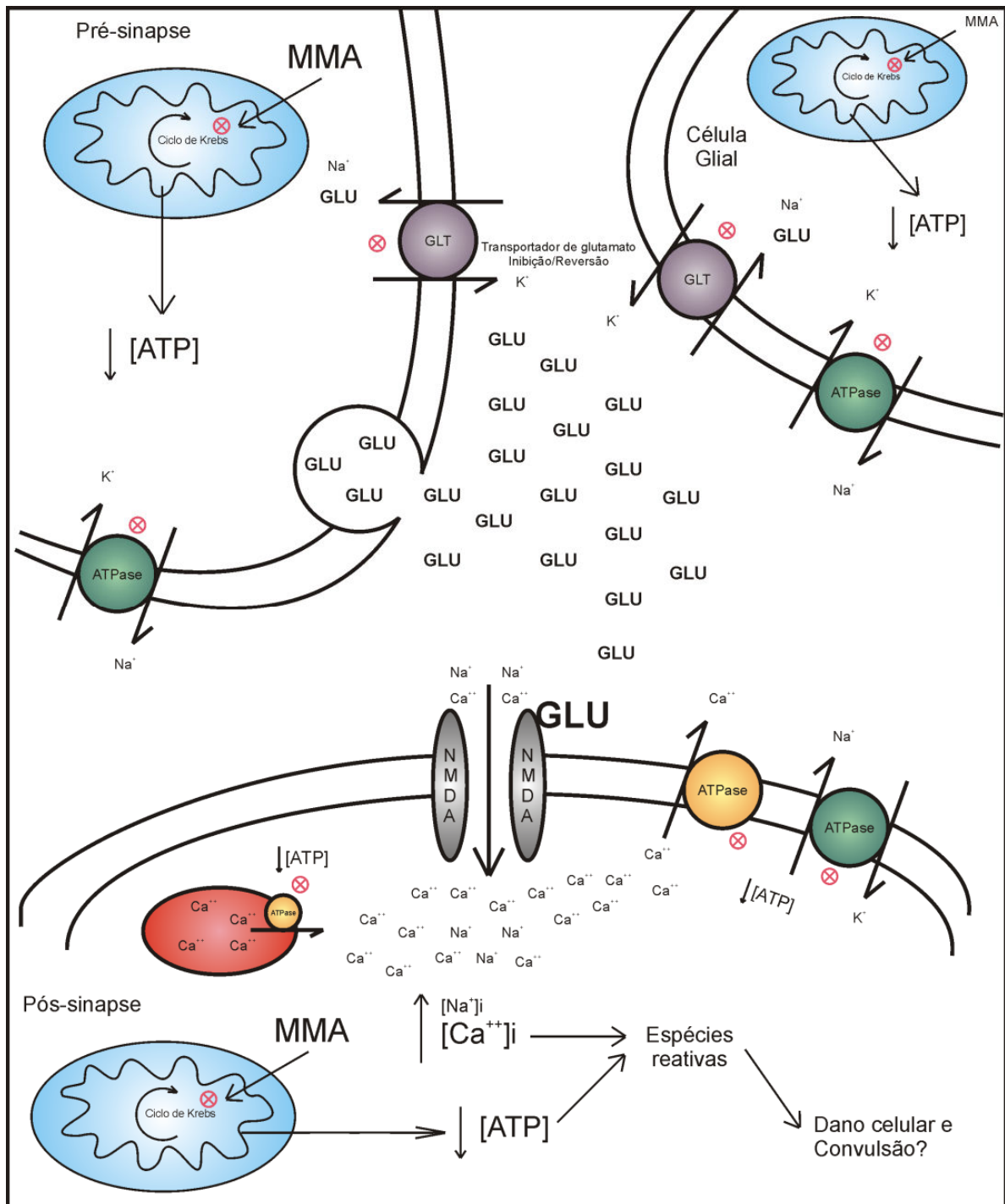


Figura 2 – Modelo de falência energética induzida pelo metilmalonato. A inibição da SDH neuronal e glial induzida pelo MMA causa falência energética e inibição das ATPases, provocando a despolarização e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca a liberação de glutamato vesicular e a perda do gradiente leva a inibição e/ou reversão dos transportadores de glutamato a nível glial e neuronal. O aumento de glutamato na fenda sináptica e a falência energética, que também atinge a membrana pós-sináptica, induz a despolarização, deslocamento de Mg^{++} presente no canal do receptor NMDA e o influxo de Ca^{++} para o meio intracelular. O acúmulo de Ca^{++} intracelular, proveniente do meio extracelular e da inibição de ATPases presentes no retículo endoplasmático, provavelmente está envolvido na propagação do foco de despolarização, na geração de radicais livres e na gênese das convulsões induzidas pelo MMA. Fonte: Tese de Luis Fernando Freire Royes, 2006.

3.2 Ácidos graxos (AG)

Os lipídios são tradicionais fontes de energia que, nos seres humanos, podem ser de origem biossintética ou obtidos através da dieta. Estes exibem diversas funções no organismo, destacando-se sua importância nas funções de reserva energética e na constituição de membranas celulares. Além disso, são agentes emulsificantes, transportadores de elétrons, cofatores enzimáticos, mensageiros intracelulares, hormônios e âncoras hidrofóbicas (Lehninger et al., 2000).

Os AG são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas (4 a 36 átomos de C) saturadas ou insaturadas. Os insaturados são classificados em séries ou famílias, de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir da metila terminal (C ômega - ω ou n). O tamanho da cadeia carbonada e o grau de insaturação são determinantes na definição das suas propriedades físicas (Lehninger et al., 2000).

3.2.1 Absorção e transporte

Quando os lipídios são consumidos, quer de alimentos naturais ou de uma forma purificada, uma série de eventos fisiológicos se inicia. Ácidos graxos com cadeia carbonada curta (até 8 C), são absorvidos diretamente no estômago para a circulação venosa. Além disso, pequenas quantidades de ácidos graxos livres (AGL) de cadeia longa podem ser absorvidos diretamente pela circulação portal (Vemuri & Kelley, 2008). A maioria dos ácidos graxos de cadeias média e longa segue direto para o lúmen intestinal, onde a bile auxilia na emulsificação, transformando-os em micelas mistas de sais biliares e triglicerídios (TG). A formação destas micelas aumenta a fração de moléculas lipídicas acessíveis à ação das lipases lipossolúveis no intestino, principalmente a lipase pancreática. Desta forma, os TG são convertidos em monoglicerídios e diglicerídios e, posteriormente, degradados completamente a AGL e glicerol pela ação da lipase pancreática (Lehninger, 2000).

Estes produtos gerados são absorvidos pelos enterócitos da mucosa intestinal por difusão passiva (Welch & Borlak, 2008).

No retículo endoplasmático dos enterócitos, os produtos da lipólise são re-esterificados a TG (Welch & Borlak, 2008) e agrupados com ésteres de colesterol dietético e apolipoproteínas específicas, formando os quilomícrons (QM; Figura 3) (Lehninger et al., 2000). Estes são então secretados no sistema linfático e transportados pelo ducto linfático torácico à veia cava superior, entrando na circulação sanguínea (Vemuri & Kelley, 2008). A lipase lipoprotéica, liberada pelas células do endotélio capilar, hidrolisa os TG dos quilomícrons, liberando AGL e glicerol. Esta enzima é ativada pelo seu cofator, a apo C-II (Lehninger et al., 2000), e inibida pela apo C-III (Vemuri & Kelley, 2008). Os AGL e glicerol liberados são captados pelas células dos tecidos periféricos para produção energia ou armazenamento (Lehninger et al., 2000).

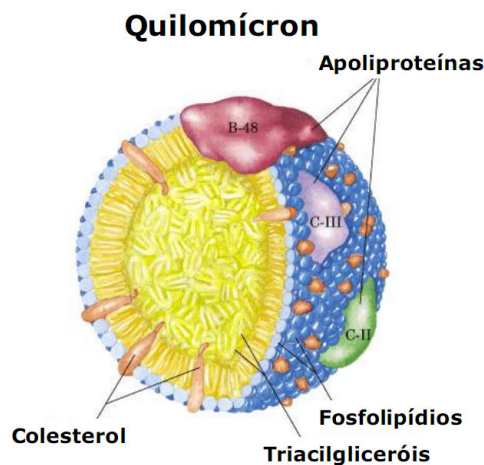


Figura 3 – Estrutura tridimensional de um quilomícron. Composto por ésteres de colesterol, TG, fosfolípidios e apolipoproteínas. Estas responsáveis pela emulsificação da lipoproteína na circulação sanguínea, e envolvidas no reconhecimento de receptores específicos. Fonte: Lehninger et al., 2000.

Os QM remanescentes são captados pelo fígado por endocitose e, posteriormente, transportados ao tecido adiposo. Este transporte se dá pela circulação sanguínea através de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Vemuri & Kelley, 2008). Os TG que entram no fígado por esta via podem ser

oxidados para fornecer energia ou servir como substrato para a síntese de corpos cetônicos (Lehninger et al., 2000).

Outra lipoproteína que desempenha um papel fundamental no transporte de lipídios endógenos é lipoproteína de alta densidade (HDL). Estas estão envolvidas no transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, um processo conhecido como “transporte reverso” (Vemuri & Kelley, 2008). No entanto, as HDL também podem ser formadas no fígado e intestino, a partir de transformações metabólicas de outras lipoproteínas em circulação (Brunham et al., 2006).

O intestino delgado também sintetiza e secreta as VLDL formadas a partir de lipídios sintetizados endogenamente no estado de jejum e pós-prandial (Vemuri & Kelley, 2008). As VLDL também são substratos para a lipoproteína lipase endotelial, perdendo TG por hidrólise e sendo transformadas em lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs). E posteriormente, em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), responsáveis pelo transporte de ésteres de colesterol para os tecidos periféricos (Vemuri & Kelley, 2008).

A função destas lipoproteínas é o transporte de lipídios do local onde são sintetizados para os tecidos onde serão metabolizados ou armazenados. As apolipoproteínas, por sua vez, são responsáveis pela solubilização e estabilização dos lipídios nas lipoproteínas, evitando assim a formação de trombos na circulação sistêmica; e, algumas também agem como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios. O conteúdo de proteínas e lipídios é determinante para a classificação das lipoproteínas em QM, VLDL, IDL, LDL, e HDL. As concentrações plasmáticas destas lipoproteínas são altamente variáveis, dependendo de fatores genéticos, idade, sexo e estado alimentar, metabólico ou hormonal (Lehninger et al., 2000; Vemuri & Kelley, 2008).

3.2.2 Metabolismo

O principal órgão responsável pelo metabolismo lipídico é o fígado (Vemuri & Kelley, 2008), que é sensível às mudanças induzidas pela dieta. Quando carboidratos, gorduras e proteínas são ingeridos em quantidades que excedam as

necessidades energéticas, o excesso é armazenado sob forma de TG. A síntese de AG ocorre no citosol das células, preferencialmente no fígado e tecido adiposo (Vemuri & Kelley, 2008). Acetil-CoA e malonil-CoA agem como doadores de C e NADPH como agente redutor. O acetil-CoA provém da mitocôndria, saindo sob forma de citrato, sendo regenerado a acetil-CoA pela citrato liase ao chegar no citosol. O malonil-CoA é formado a partir da condensação do acetil-CoA com bicarbonato, pela ação da acetil-CoA carboxilase (ACC), tendo a biotina como cofator. A partir da combinação do acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH ocorre a síntese dos AG (Lehninger et al., 2000; Vemuri & Kelley, 2008). A Figura 4 exhibe os mecanismos moduladores desta síntese. A regulação da enzima ACC é obtida, geralmente, através do fornecimento de acetil-CoA ou citrato produzido pelo ciclo de Krebs. O palmitoil-CoA é um forte inibidor da ACC *in vitro* (Vemuri & Kelley, 2008).

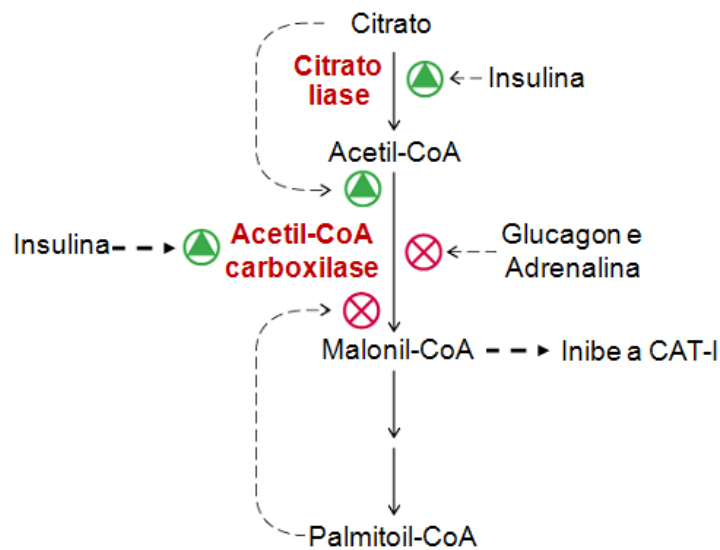


Figura 4 – Mecanismos de regulação da síntese de ácidos graxos (AG). O citrato realiza um controle alostérico positivo sobre a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), enquanto o palmitoil-CoA um controle negativo. O glucagon e a adrenalina causam inativação da ACC, pois pelo aumento de AMPc, a mantém fosforilada; já a insulina a ativa. O malonil-CoA inibe a carnitina acil-transferase I (CAT-I), inibindo o transporte de AG para o interior das mitocôndrias. Fonte: Lehninger et al., 2000.

O ácido palmítico livre (16:0), liberado no processo de síntese, pode ser esterificado a lipídios complexos, alongado a ácido esteárico (18:0), ou dessaturado a ácido palmitoléico (16:1n-9) (Vemuri & Kelley, 2008). O ácido esteárico, por sua

vez, pode ser alongado a ácidos graxos saturados mais longos ou dessaturado a ácido oléico (AO; 18:1n-9) para armazenamento (Lehninger et al., 2000), conforme Figura 5.

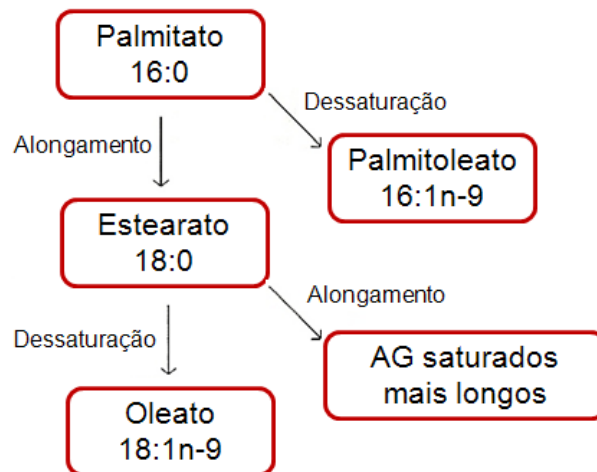


Figura 5 – Formação do ácido oléico. Conversões possíveis de ocorrer nos mamíferos a partir do ácido palmítico. Fonte: adaptado de Lehninger et al., 2000.

Já, a obtenção de energia, a nível celular, ocorre principalmente através da oxidação de AG provenientes de três fontes principais: dieta, síntese endógena e, TG armazenados no tecido adiposo. Hormônios, como a adrenalina e o glucagon, promovem a liberação destes AG armazenados, através da ativação da adenilato ciclase na membrana dos adipócitos e consequente aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. Uma proteína quinase, dependente de AMPc, fosforila e ativa a enzima lipase hormônio-sensível. Esta, por sua vez, catalisa a hidrólise dos TG, promovendo a liberação dos AG dos adipócitos para a circulação (Figura 6). O glicerol formado é transportado até o fígado para a produção de glicerol-3-fosfato, que é substrato para a glicólise e gliconeogênese (Lehninger et al., 2000; Szepesi, 2008).

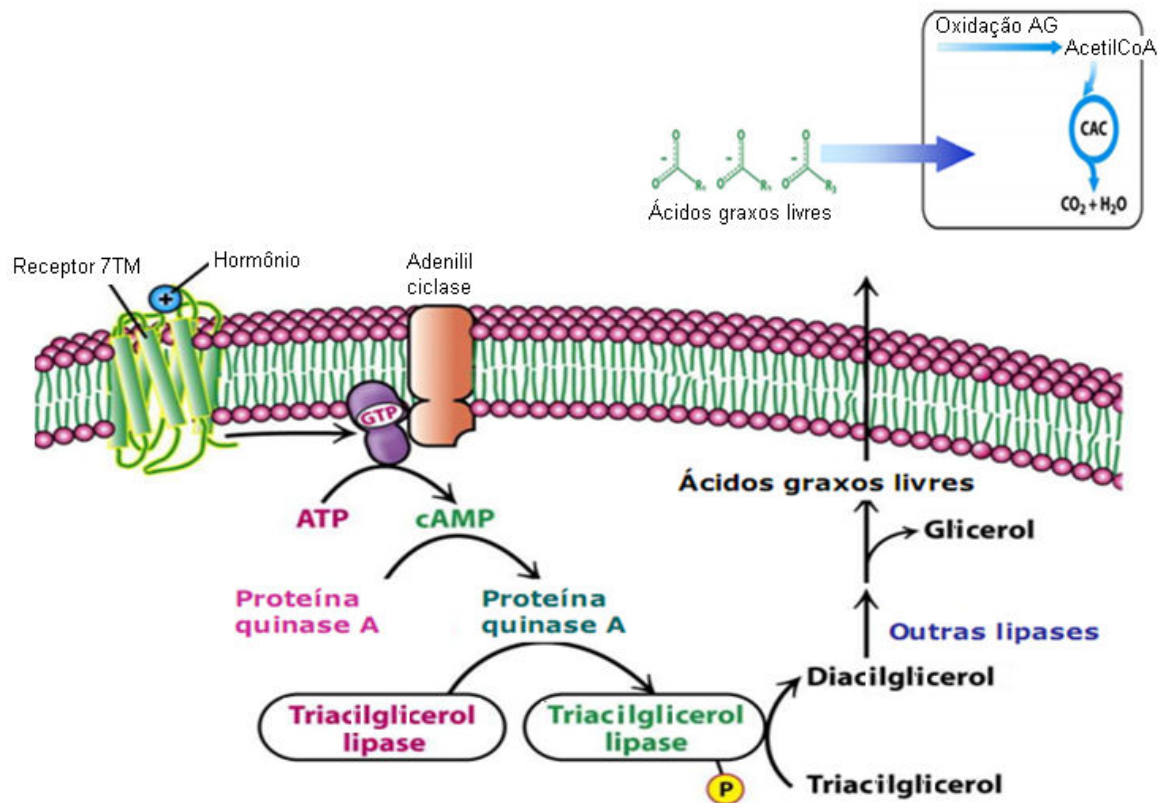


Figura 6 – Mecanismo hormônio-sensível de liberação dos ácidos graxos (AG). Fonte: modificado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi.

Os AGL são β -oxidados por sistemas enzimáticos, na matriz mitocondrial, formando ATP, CO₂ e H₂O (Vemuri & Kelley, 2008). O funcionamento deste sistema é dependente de carnitina, que realiza o transporte dos AGL do citosol para o interior das mitocôndrias. Sucessivas reações de β -oxidação formam acetil-CoA, NADH e FADH₂, substratos para o ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons (Szepesi, 2008).

3.2.3 Ácidos graxos (AG) dietéticos

Como anteriormente descrito, os AG ingeridos na dieta são utilizados para a produção de energia ou armazenamento. Além destas vias, ocorre a produção de metabólitos, como os eicosanóides, a partir da ação das enzimas ciclooxigenase (COX; EC 1.14.99.1) e lipooxigenase (LOX; EC 1.13.11.-). Este metabolismo é

amplamente dependente do tipo e quantidade de AG ingeridos e do gasto energético (Lee & Hwang, 2008).

Os ácidos graxos α -linolênico (ALA; C18:3n-3), linoléico (LA; C18:2n-6) e oléico (AO; C18:1n-9) originam as famílias n-3, n-6 e n-9, respectivamente (Figura 7). Destes, somente o AO (n-9) pode ser biossintetizado pelos mamíferos. Cada família é sintetizada a partir de um ácido graxo precursor específico (18 C) que passa por sucessivas reações de dessaturação e alongamento (Lauritzen et al., 2001; Mazza et al., 2007), originando os outros membros com 20 a 22 átomos de carbono, através da via metabólica.

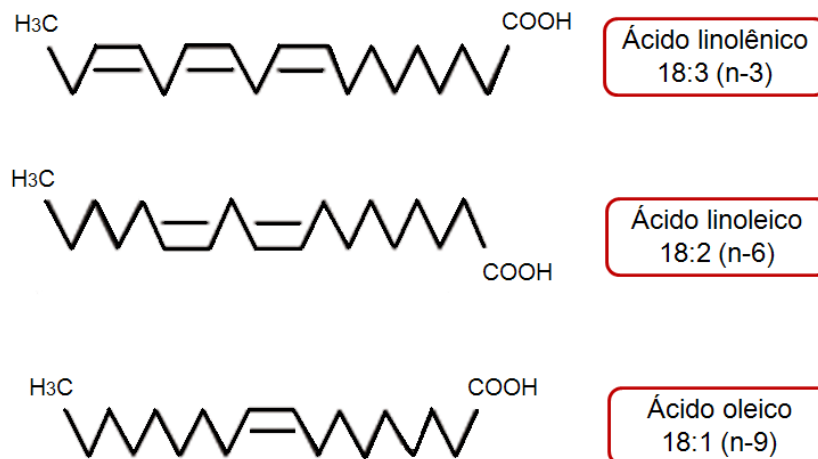


Figura 7 – Estrutura química dos ácidos graxos precursores (18 C) das famílias n-3, n-6 e n-9.
Fonte: adaptado de Lehninger et al., 2000.

Estes ácidos graxos insaturados competem enzimaticamente no processo de formação dos seus metabólitos poli-insaturados de cadeia longa, conforme ilustra a Figura 8. As enzimas desta via metabólica possuem uma maior especificidade pelos AG da família n-3; seguindo a ordem decrescente $n-3 > n-6 > n-9$ (Chapkin, 2008). Desta forma, é necessário um equilíbrio no aporte dietético destes AG para produzir a mesma quantidade de produto (Simopoulos, 2002).

O ALA (n-3) e o LA (n-6) são denominados essenciais, pois não podem ser biossintetizados pelos seres humanos, sendo obtidos exclusivamente através da

dieta (Das, 2006). Apenas alguns vegetais possuem os sistemas enzimáticos necessários de dessaturar os AG nas posições n-6 ou n-3 da cadeia (Chapkin, 2008).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), produzidos a partir dos ácidos graxos essenciais (AGE), constituem aproximadamente 20 % do peso seco cerebral, dos quais um terço é ácido docosahexaenóico (DHA) (Dyall & Michael-Titus 2008). Estes AGPI são fundamentais para a integridade estrutural das membranas, podendo influenciar na atividade neuronal (Bourre et al., 1991). De acordo com Salem et al. (1999) a composição dos fosfolipídios das membranas celulares depende, em grande parte, da quantidade e do tipo de AGPI ingeridos na dieta.

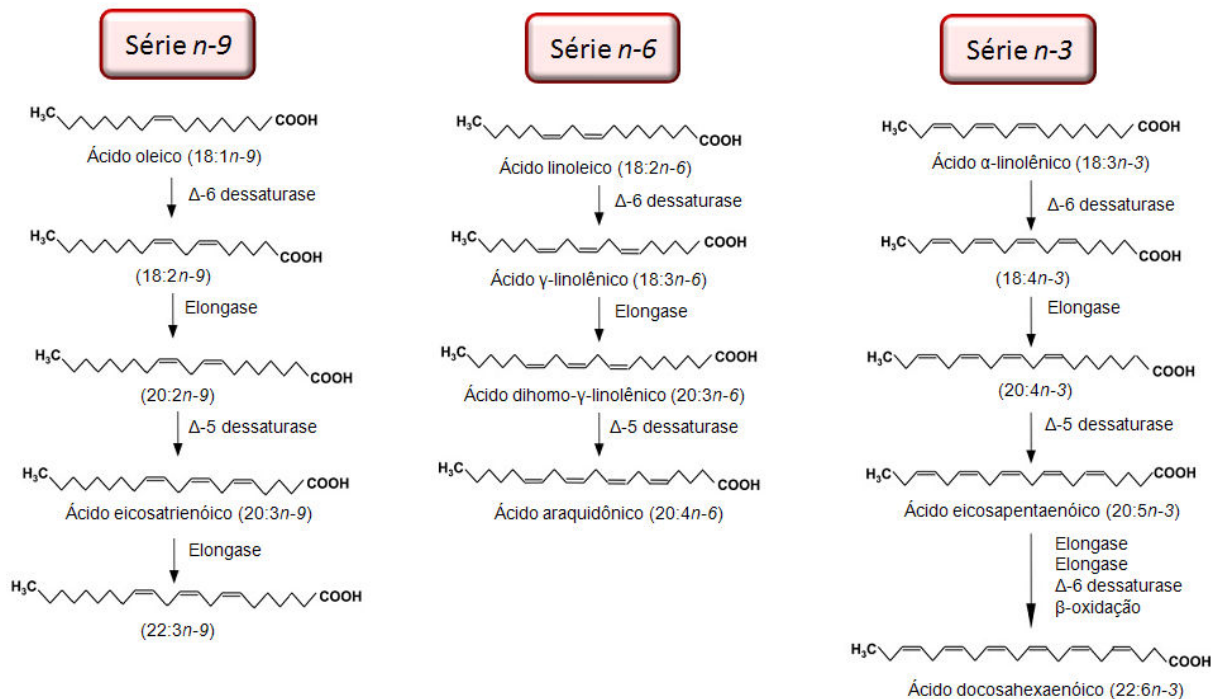


Figura 8 – Vias metabólicas das famílias n-3, n-6 e n-9. Conversão dos ácidos graxos insaturados precursores nos seus metabólitos poli-insaturados de cadeia longa. O ácido α-linolênico origina os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Já os ácidos linoléico e oléico são precursores do ácido araquidônico (AA) e ácido 5, 8, 11-eicosatrienóico (ETA), respectivamente. Fonte: modificado de Calder, 2006.

Na ausência de AGE na dieta, ocorre um deslocamento da via para a produção de ácido eicosatrienóico (ETA; C20:3n-9) ou "ácido de Mead", a partir do

AO (n-9) (Fulco & Mead, 1959). Este AGPI de cadeia longa da série n-9 não é um AGE, no entanto, é incorporado em fosfolipídios quando há deficiência de AGE. O ETA (n-9) não é um substrato para a COX, porém pode ser metabolizado pela enzima 5-lipooxigenase (5-LOX; EC 1.13.11.34) (Jakschik et al., 1983, James et al., 2000).

Entre as principais fontes de AGPI n-3 estão o óleo de alguns peixes, óleos de canola, linhaça e de nozes (Hulber et al., 2004). Os AGPI n-6 compõem principalmente os óleos vegetais de sementes de milho, girassol, soja, e outros (Bartsch et al., 1999). Já o ácido oléico (n-9) é o mais comum dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), estando presente em maior quantidade no óleo de oliva (Trichopoulou & Critselis, 2004).

3.2.4 Conversão a eicosanóides

Eicosanóides são substâncias, com 20 átomos de C (do grego, “*eicosi*” significa “vinte”) formadas a partir dos AGPI de cadeia longa (Bergstroem et al., 1964). Os eicosanóides são considerados autacóides, ou seja, substâncias que são geradas e agem localmente, com meia-vida curta (segundos) (Campbell & Halushka, 1996).

Através de estímulos mecânicos, físicos e/ou produzidos por diversos mediadores, o ácido eicosapentaenóico (EPA), o DHA, o ácido araquidônico (AA) ou o ETA (n-9) são liberados dos fosfolipídios de membrana por ação de acil-hidrolases, particularmente da fosfolipase A₂ (PLA₂) (Needleman et al., 1986; Akiba & Sato, 2004). As enzimas PLA₂ podem ser classificadas em três grupos: a PLA₂ citosólica (PLA_{2c}), a PLA₂ secretada (PLA_{2s}) e a PLA₂ citosólica independente de Ca⁺⁺ (PLA_{2i}) (Yedgar et al., 2000). O substrato determina o tipo de PLA₂, por exemplo, o AA é liberado principalmente pela ação da PLA_{2c}, enquanto o DHA é liberado pela ação da PLA_{2i} (Rosa & Rapoport, 2009).

Após a ação da PLA₂, os AG estão na forma livre e, conseqüentemente são substratos para as enzimas COX e/ou LOX para produzir prostanóides (prostaglandinas – PG e tromboxanos – TX) e leucotrienos (LT), respectivamente (Yedgar et al., 2000), como ilustra a Figura 9.

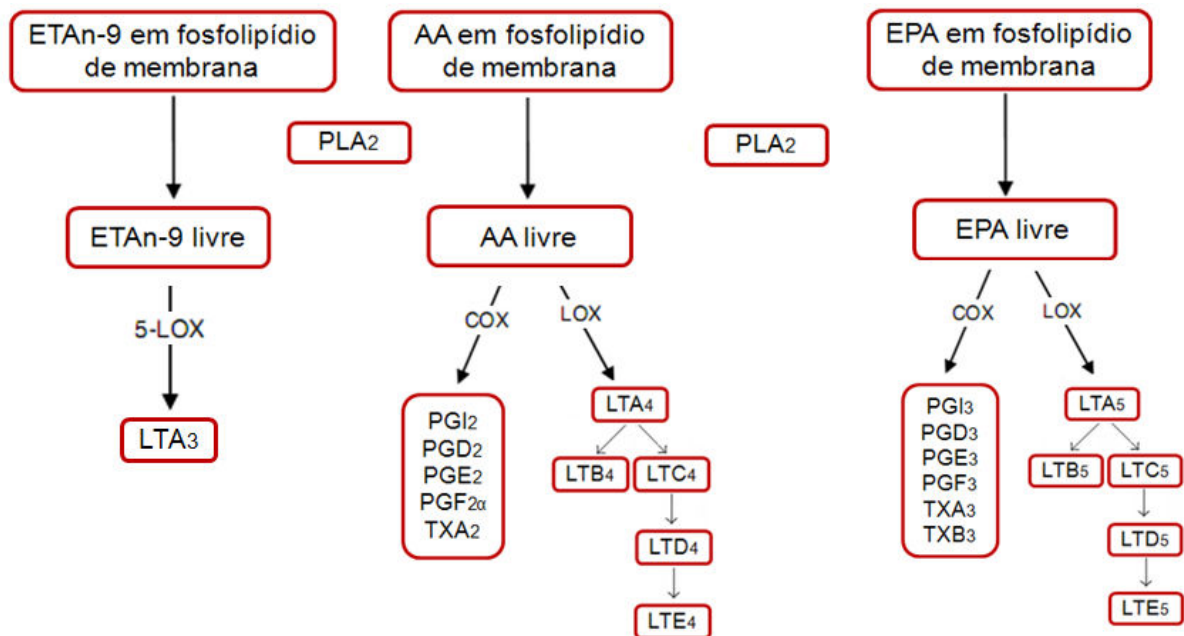


Figura 9 – Biossíntese de eicosanóides a partir dos AGPI. O ETA (n-9), AA (n-6) e EPA (n-3) são liberados dos fosfolípidos de membrana pela ação da PLA₂. No passo seguinte, as enzimas COX e/ou LOX catalisam a formação de prostanóides e leucotrienos específicos para cada substrato. Fonte: modificado de Calder, 2006.

A COX, também chamada de prostaglandina H₂ sintase (PGHS), foi purificada em 1976 a partir de vesículas seminais de ovelha (Hemler, 1976; Miyamoto, 1976), e é considerada limitante da velocidade na rota de biossíntese de PG e TX. Existem duas isoformas: a COX-1, constitutiva em muitos tecidos; e a COX-2, associada a respostas inflamatórias e induzida por citocinas, fatores tumorais e fatores de crescimento (Cao et al., 1996). Assim, as PG produzidas via COX-1 são usualmente relacionadas à homeostase fisiológica incluindo a manutenção do tônus da musculatura lisa, agregação plaquetária, e proteção da mucosa gástrica (Smith et al., 2000; Simmons et al., 2004). Durante uma resposta inflamatória, a isoforma COX-2 é induzida na maioria dos tecidos contribuindo para o reparo da lesão e para a cronificação (Smith et al., 2000; Simmons et al., 2004). Esta isoforma também se encontra na forma constitutiva, sendo expressa no fígado, estômago e cérebro (Hoffmann, 2000). Recentemente, foi sugerida a existência de outra isoforma expressa principalmente no SNC, a COX-3. Mas, na verdade, trata-se de uma

variante de “splicing” da COX-1, que retém o íntron 1 do seu RNAm. Isto confere às proteínas COX-1 e COX-3 uma diferença de 30 a 34 aminoácidos, dependendo da espécie, dentro da região hidrofóbica (Mitchell & Warner, 2006). Contudo, ainda existem controvérsias a respeito desta isoforma ser cataliticamente ativa e sobre suas funções no organismo (Davies et al., 2004; Simmons et al., 2004; Kis et al., 2005).

No SNC, a COX-2 é encontrada principalmente no córtex, hipocampo, amígdala (Yamagata et al., 1993), hipotálamo, neurônios, mas também em células não-neuronais, como astrócitos, células da microglia, células da meninge e do plexo coróide (Vane et al., 1998; Tomimoto et al., 2000). Quantitativamente, a COX-2 é mais abundante em neurônios glutamatérgicos do hipocampo e córtex cerebral, e nestas células esta enzima está localizada nos espinhos dendríticos, onde ocorre a transmissão sináptica (Kaufmann et al., 1996).

O AA é o principal substrato da COX-2, produzindo cinco prostanóides bioativos *in vivo*: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂. Quantitativamente a principal PG produzida no cérebro, por esta via, é a PGE₂ (Vidensky et al., 2003; Sang et al., 2005), isto porque a COX-2 está metabolicamente acoplada à PGE₂ sintase (Bosetti et al., 2004). Embora o AA seja normalmente metabolizado pela COX-2, a presença do EPA inibe competitivamente esta via. A metabolização do EPA gera prostanóides da série 3, com características menos inflamatórias que aqueles produzidos a partir do AA (Willian & Dubois, 1996). A COX-2 também pode usar endocanabinóides como anandamida e 2-araquidonil-glicerol como substratos. Tem sido proposto que este metabolismo é importante na regulação das funções destes neuromodulares (Kim & Alger, 2004; Slanina & Schweitzer, 2005a; Slanina et al., 2005b).

As LOX são dioxigenases que, embora contenham ferro, são desprovidas de heme. Estas enzimas inserem oxigênio molecular nas posições 5, 12 ou 15 das cadeias alifáticas do substrato, dependendo da isoforma: 5-LOX, 12-LOX (EC1.13.11.31) ou 15-LOX (EC 1.13.11.33), respectivamente. A atividade de cada uma destas enzimas resulta em diferentes metabólitos, dependendo do substrato e do local de ação (MacNamara, 2006, Phillis et al., 2006, Vance & Vance, 2008). No SNC encontram-se principalmente em neurônios do córtex, astrócitos e oligodendrócitos (Smyth et al., 2006).

A produção de LT é mediada pela ação da 5-LOX, que igualmente a COX-2, tem o AA como seu principal substrato. Esta reação é realizada em dois estágios: (1)

oxigenação do AA no C5 para formar ácido hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE); (2) desidratação do 5-HPETE formando o LTA₄, um composto instável, o qual é biotransformado em LT bioativos (Denzlinger, 1996, MacNamara, 2006). O LTA₄ pode ser convertido em LTB₄, LTC₄ ou ainda, sofrer metabolização transcelular. O LTB₄ é formado através da LTA₄ hidrolase, uma enzima citosólica que contém zinco como seu centro catalítico. Já a ação da enzima LTC₄ sintase produz o LTC₄ pela conjugação da glutathiona ao C6 do LTA₄ (Denzlinger, 1996, Chu & Pratico, 2009). Quando ocorre a metabolização transcelular do LTA₄, os LTB₄ e LTC₄ são exportados ao espaço extracelular. Este último é convertido em LTD₄ pela γ -glutamil transferase (γ -GT) e em seguida a LTE₄. Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ são denominados cisteínicos ou peptídicos (Denzlinger, 1996, Vance & Vance, 2008, Chebolu et al., 2009).

De forma semelhante ao apresentado na formação de prostanóides, a 5-LOX também possui outros substratos. A partir do EPA são formados LT da série 5 e a partir do ETA (n-9) é formado, principalmente, o LTA₃ (Jakschik et al., 1983, James et al., 1993, James et al., 2000).

3.3 Inflamação, convulsões e ácidos graxos (AG)

3.3.1. O processo inflamatório

A inflamação pode ser definida como uma resposta do sistema imunológico a danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química e/ou física. O objetivo desta resposta é proteger o organismo contra infecções, bem como reparar os tecidos após eventuais danos (Haanen & Vermes, 1995). O processo inflamatório é caracterizado pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, vasodilatação e recrutamento de células para o sítio inflamatório. Estas alterações bioquímicas e celulares são reguladas por mediadores produzidos por células do sistema imunológico e células residentes no tecido.

De maneira geral, o processo inflamatório é dividido em duas fases: aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda inicia imediatamente após a agressão tecidual e pode ser observada pela presença de edema, causado pela exsudação de fluidos para o interstício. Por outro lado, a inflamação crônica é caracterizada pela migração de leucócitos da circulação sanguínea para a área lesionada, com a formação de um tecido granulomatoso (Adams, 1976). No entanto, na fase aguda também existe o envolvimento de neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, são os monócitos/macrófagos que migram para o sítio inflamatório (Huerre & Gounon, 1996).

Yoon & Baek (2005) resumem a atividade inflamatória em duas vias principais: uma via dependente do AA e outra independente. A via dependente de AA está diretamente relacionada à produção de prostanóides (PG e TX) e LT a partir do AA. Entre os mecanismos moleculares de atividade inflamatória independente da via do AA podem ser citados: os produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina); componentes do sistema complemento; moléculas de adesão; citocinas; produção de óxido nítrico (NO) (Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004); a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo (Barros et al., 2010); e a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), dentre outros.

Os eicosanóides produzidos pela família n-6 (AA), principalmente PG da série 2 e LT da série 4, apresentam potente efeito inflamatório, elevada capacidade de induzir agregação plaquetária e quimiotática (Calder, 2006). Como descrito anteriormente, a PGE₂ é o principal prostanóide produzido por esta via, exercendo importantes funções no processo inflamatório, como a regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias em vários tipos celulares (Hinson et al., 1996; Fiebich et al., 1997; Williams & Shacter, 1997). A PGE₂ exerce suas ações por interagir com receptores de membrana específicos, de quatro subtipos: EP1, EP2, EP3 e EP4 (Coleman et al., 1994; Ushikubi et al., 1998; Narumiya et al., 1999; Sugimoto & Narumiya, 2007) que são codificados por genes distintos (Negishi et al., 1995). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (com sete domínios transmembrana) e ativam a adenilil ciclase ou a fosfolipase C (PLC) (Machwate et al., 2001). Os LT não cisteínicos estão envolvidos no processo inflamatório, em virtude de induzir a adesão de neutrófilos às células do endotélio vascular e intensificar a migração destes para os

tecidos extravasculares. Em concentrações elevadas, o LTB_4 estimula a agregação de leucócitos polimorfonucleares promovendo a degranulação e a geração de superóxido (Denzlinger, 1996). Esta atividade quimiotática dos LT não cisteínicos é mediada por dois receptores acoplados à proteína G: BLT_1 e BLT_2 , sendo o primeiro expresso exclusivamente em leucócitos polimorfonucleares humanos (Vance & Vance, 2008). Estudos com camundongos nocaute para BLT_1 confirmaram o envolvimento deste LT na quimiotaxia, adesão e no recrutamento de leucócitos nos tecidos inflamados (Smyth et al., 2006).

No entanto, os eicosanóides produzidos pela família n-3, PG e TX da série 3 e LT da série 5, possuem propriedades “anti-inflamatórias” ou menos inflamatórias (Calder, 2006) que aqueles produzidos pelo AA. LTA_5 , por exemplo, pode ser considerado um agonista fraco e parcial do LTB_4 , em relação às respostas quimiotáticas (Goldman et al., 1983).

O produto da família n-9 (ETA n-9), LTA_3 , é um potente inibidor da enzima LTA_4 hidrolase, o que conseqüentemente impede a formação do LTB_4 que, como descrito, é um importante mediador inflamatório (Jakschik et al., 1983, James et al., 1993, James et al., 2000). A convergência destas vias pode ser visualizada pela Figura 10.

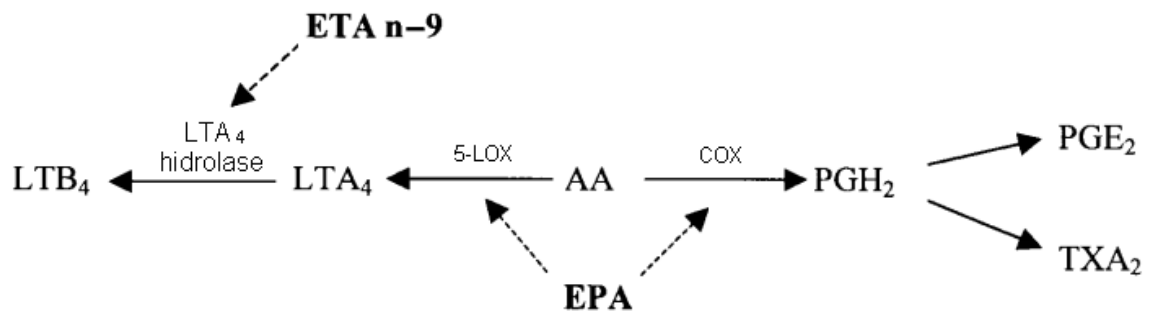


Figura 10 – Convergência das vias metabólicas do EPA, AA e ETA. Fonte: adaptado de James et al., 2000.

A família n-3 possui uma série de outros efeitos anti-inflamatórios independentes do antagonismo ao metabolismo do AA. Estudos realizados com

culturas de células mostraram que EPA e DHA inibem a produção de IL-1 β e TNF- α por monócitos e a produção de IL-6 e IL-8 por células endoteliais venosas. A alimentação com óleo de peixe (rico em AGPI n-3) diminui a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por macrófagos de roedores e também as concentrações circulantes destas citocinas na endotoxemia, *ex vivo*. Esta redução na produção de citocinas também foi verificada em células mononucleares humanas (Calder, 2006). Além disso, (De Caterina & Libby, 1996) mostraram, em cultivo de células endoteliais incubadas com DHA, uma significativa diminuição na expressão de moléculas de adesão como a E-selectina, molécula de adesão celular intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1).

Recentemente foi postulado que o EPA e o DHA são precursores de importantes mediadores lipídicos, a resolvina E1 e a neuroprotectina D1, respectivamente (Le et al., 2009). A resolvina E1 está envolvida na redução da resposta inflamatória pela regulação do extravasamento leucocitário e pela redução da agregação plaquetária (Arita et al., 2005; Dona et al., 2008). Já a neuroprotectina D1 atua protegendo os neurônios e as células da retina da apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Mukherjee et al., 2004).

3.3.2 Mecanismos putativos das convulsões

O potencial de ação, ou impulso nervoso, é transmitido de uma célula para outra por uma sequência de eventos que se inicia com a despolarização da membrana pré-sináptica. Com a despolarização da membrana pré-sináptica ocorre uma breve abertura dos canais de Ca⁺⁺, promovendo o influxo deste íon. A interação do cálcio com proteínas específicas promove a fusão e exocitose de vesículas sinápticas, resultando na liberação de neurotransmissores. Estes neurotransmissores interagem com receptores pós-sinápticos acoplados a canais de sódio e de cálcio, o que desencadeia a despolarização da membrana e a consequente propagação do impulso nervoso (Junqueira & Carneiro, 2006, Machado, 2006). O aumento na concentração de cálcio intracelular e o potencial de membrana mais positivo

promovem a abertura de canais de potássio, cuja saída do meio intracelular reestabelece o potencial de membrana de repouso.

Quando as despolarizações ocorrem de forma excessiva e sincronizada em uma população de neurônios, dá-se a convulsão. Desta forma, o controle do potencial de repouso dos neurônios é fundamental para a prevenção de convulsões (Machado, 2006). O glutamato e o ácido γ -aminobutírico (GABA), principais neurotransmissores envolvidos nas convulsões, apresentam efeitos opostos. O GABA pode se ligar a dois tipos de receptores, o GABA_A, que consiste em um canal iônico pós-sináptico ativado por ligante, permeável a íons Cl⁻ e responsável por um estado de hiperpolarização; e o GABA_B, receptor metabotrópico acoplado à proteína-G, presente tanto na pré quanto na pós-sinapse, capaz de inativar os canais de Ca⁺⁺ voltagem-dependentes e abrir os canais de K⁺ (MacNamara, 2006). Já os receptores glutamatérgicos, são capazes de abrir tanto os canais de Na⁺ quanto os de Ca⁺⁺ (Engel Jr. & Pedley, 2008; Kleen & Holmes, 2008). Sendo assim, tanto a diminuição no potencial inibitório pós-sináptico (PIPS) quanto um aumento no potencial excitatório pós-sináptico (PEPS), seriam os prováveis mecanismos responsáveis pelo início da crise convulsiva. Entretanto, as circunstâncias que levam a estes estados de ativação, importantes para a epileptogênese, podem ter outros fatores desencadeantes (Engel Jr. & Pedley, 2008).

Estudos recentes relatam que a chave do processo de epileptogênese pode estar no sistema vascular (Fabene et al., 2008, Kleen & Holmes, 2008). Segundo Fabene et al. (2008) a administração de pilocarpina em ratos aumenta a expressão de moléculas de adesão leucocitárias à barreira hemato-encefálica (BHE), que são importantes intermediários para o extravasamento celular durante o processo inflamatório. Os animais que não apresentam aumento na expressão destas moléculas de adesão exibem menos convulsões. Estes dados sugerem uma ligação patológica entre a interação dos leucócitos com o endotélio, o dano na BHE e a geração de convulsões. Assim, tem sido proposto que as convulsões estão diretamente associadas a alterações inflamatórias vasculares do SNC (MacNamara, 2006).

As reações inflamatórias no SNC parecem surgir a partir da ativação do sistema imunológico inato e do adaptativo. No cérebro de roedores, como parte do mecanismo imunológico inato, os mediadores inflamatórios são produzidos durante a atividade epiléptica pela microglia, astrócitos e neurônios (Rothwell & Luheshi, 2000). Em tecido epiléptico humano, evidências sugerem que a imunidade

adaptativa e a inata contribuem pra a indução e perpetuação da neuroinflamação (Vezzani et al., 2008) que possui muitas características celulares e bioquímicas diferentes da resposta periférica. Em particular, citocinas como a interleucina IL-1 β , TNF- α e IL-6, embora expressos em níveis muito baixos em tecido cerebral saudável, são rapidamente induzidos após isquemia, trauma e convulsões (Vezzani, 2005). A extensão da neuroinflamação normalmente é regulada por uma variedade de processos envolvendo, principalmente, citocinas anti-inflamatórias como a interleucina IL-10 e endocanabinóides, estes através da ação sobre os receptores CB2 (Laye, 2010).

Na tentativa de solucionar estas questões, citocinas e mediadores pró-inflamatórios têm sido dosados no cérebro, no líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou no sangue, após convulsão induzida em modelos experimentais e em casos clínicos de epilepsia (Vezzani et al., 2008). Esforços têm sido dedicados a descrever a localização e a expressão de células específicas de moléculas pró-inflamatórias e sua sinalização no cérebro. As citocinas podem diminuir o limiar para a indução da convulsão e/ou prolongar a duração das crises convulsivas. Além disso, mediadores inflamatórios afetam a sobrevivência neuronal, induzem proliferação celular glial, modificam a permeabilidade da BHE e inibem a neurogênese (Allan, 2001).

Resultados experimentais mostram dupla função da inflamação no SNC, podendo ser neuroprotetora (pela redução das infecções) ou neurotóxica, por ativar mecanismos endógenos de excitotoxicidade (Nguyen et al., 2002; Stoll et al., 2000; Allan et al., 2001). Os efeitos neurotóxicos das citocinas e outros mediadores inflamatórios se devem ao aumento do glutamato extracelular, que causa um aumento na atividade dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e a ativação de mecanismos intracelulares envolvidos na produção de espécies reativas e outros mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO) e o AA (Allan et al., 2001). Estudos bioquímicos têm mostrado que a IL-1 β pode facilitar a neurotransmissão glutamatérgica, por inibir a recaptação de glutamato pelos astrócitos, aumentando os níveis extracelulares de glutamato, que promove a ativação dos receptores NMDA e conseqüentemente o influxo de Ca⁺⁺ (Vezzani, 2008). Além disso, a IL-1 β também diminui as correntes mediadas por GABA em culturas de neurônios hipocâmpais (Wang et al., 2000) aumentando assim a excitabilidade. O efeito do TNF- α sobre as convulsões depende dos níveis desta citocina no cérebro e dos subtipos de receptores ativados. A administração i.c.v. de TNF- α , em baixas doses, reduz as convulsões por

interagir com o receptor TNF- α p75 (Balosso et al, 2005). Camundongos que superexpressam altos níveis de TNF- α na glia apresentam convulsões espontâneas, dependente da idade e da degeneração, possivelmente mediada pelo receptor p55 (Akassoglou et al., 1997). Uma direta interação entre TNF- α e receptor AMPA foi demonstrada em neurônios hipocâmpais. O TNF- α , por meio dos receptores p55, aumenta a disponibilidade de receptores AMPA na membrana celular, mas reduz a densidade de receptores GABA_A (Stellwagen, 2005), amplificando as respostas glutamatérgicas (Vezzani, 2008).

Estudos com camundongos transgênicos sugerem que a pré-existência de uma condição inflamatória crônica no cérebro pode predispor a ocorrência de convulsões e promover disfunções neurológicas. De fato, a administração sistêmica de LPS em camundongos adultos diminui o limiar da indução de convulsão e este efeito é bloqueado por anti-inflamatórios (Sayyah et al., 2005).

Uma questão fundamental é saber se a inflamação é um componente etiológico da epilepsia, e/ou uma consequência das convulsões e do dano celular (Pitkanen et al., 2002). Neste contexto, tem sido demonstrado o envolvimento das PG nas convulsões, pois a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ atenua as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). E, a administração i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das convulsões induzidas por PTZ, bem como por MMA, no hipocampo de ratos (Oliveira et al., 2008b; Oliveira et al., 2009; Salvadori et al, 2010).

3.3.3 Aspectos fisiológicos e funcionamento da Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína de membrana plasmática, presente nas células eucarióticas, fundamental na manutenção da homeostase iônica celular (Skou & Esmann, 1992). A reação básica catalisada pela Na⁺,K⁺-ATPase (conforme esquema na Figura 11) é o transporte de 3 íons Na⁺ para o meio extracelular e de 2 íons K⁺ para o meio intracelular, usando energia proveniente da hidrólise de 1 ATP (Skou & Esmann, 1992). Ao regular o gradiente de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática a Na⁺,K⁺-ATPase regula também, de maneira indireta a concentração

intracelular de outros íons, como Ca^{++} , Cl^- e H^+ , e substâncias como água e glicose (Skou & Esmann, 1992).

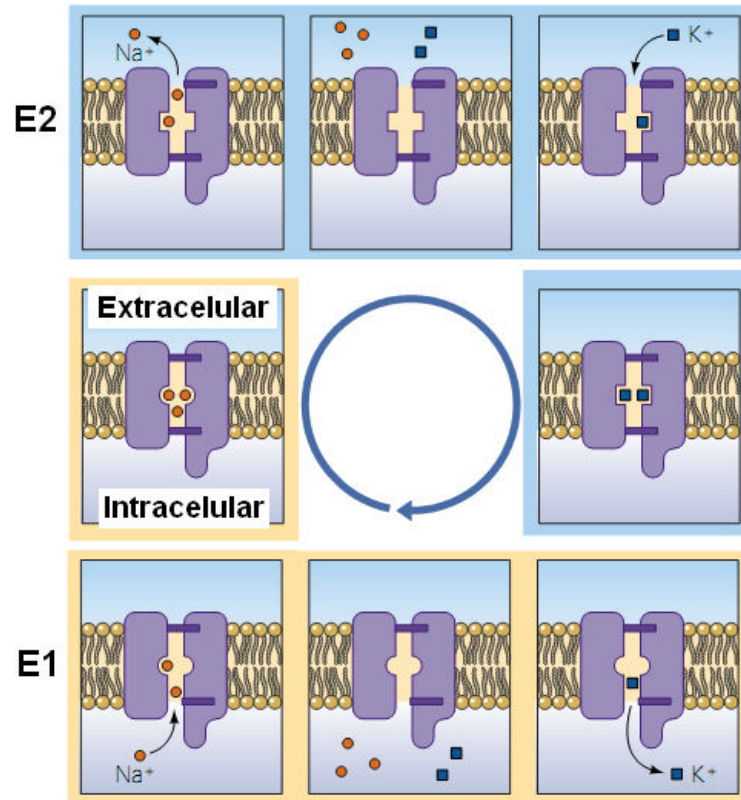


Figura 11 – Esquema de funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase. Os sítios de ligação para os cátions são acessíveis alternadamente do lado citoplasmático (conformação E1) e do lado extracelular (conformação E2) da membrana. O processo inicia-se com a ligação de 3 Na^+ aos sítios de alta afinidade, na superfície interna da membrana no interior da célula (E1). A fosforilação da enzima altera sua conformação e diminui sua afinidade por Na^+ , levando a liberação deste no meio extracelular e a ligação de 2 K^+ em sítios de alta afinidade presentes na porção extracelular (E2). Após a ligação do K^+ a enzima é desfosforilada e retorna a sua configuração anterior. Desta forma ocorre a liberação do K^+ no meio intracelular (E1) e a proteína está pronta para um novo ciclo de bombeamento. Fonte: adaptado de Horisberger, 2004.

A atividade da Na^+, K^+ -ATPase, no cérebro, é fundamental para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores (Stahl & Harris, 1986). Consequentemente, alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afetam a sinalização celular e a atividade neuronal (Moseley et al., 2007). Neste contexto, uma redução no funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal,

dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (Grisar et al., 1992). A ouabaína, um inibidor da Na^+, K^+ -ATPase, aumenta o influxo de Ca^{++} em slices de cérebro de ratos (Fujisawa et al., 1965), causa convulsões em camundongos (Jamme et al., 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (Li & Stys, 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (Lees et al., 1990). Além disso, a supressão genética da Na^+, K^+ -ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (Moseley et al., 2007). Também é importante mencionar que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída no cérebro *post-mortem* de pacientes com epilepsia (Grisar et al., 1992). Além disso, o grau de inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzido pela administração i.c.v. de MMA, de ácido glutárico ou injeção intraperitoneal de PTZ se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por estes agentes (Figuera et al., 2006; Furian et al., 2007; Souza et al., 2009), reforçando o papel importante da inibição da atividade Na^+, K^+ -ATPase nas convulsões.

3.3.4 Efeitos biológicos de ácidos graxos (AG)

O óleo de peixe, rico em AGPI n-3, diminui o risco de eventos cardiovasculares, doença isquêmica cardíaca e morte súbita (Leaf, 2001; Leaf et al., 2003; Lichtenstein et al., 2006; von Schacky & Harris, 2007; Lee et al., 2009). Tais efeitos biológicos tem sido atribuídos às suas propriedades anti-inflamatórias (Mori & Beilin, 2004; Calder, 2006) e anti-trombóticas (Blok et al., 1996; Engstrom et al., 2001).

Também tem sido sugerido que a suplementação com AGPI n-3 exerce efeito neuroprotetor e tem valor terapêutico em várias doenças neurológicas (Coluccia et al., 2009), incluindo a prevenção de crises convulsivas em pacientes epiléticos (Schlanger et al., 2002; Yuen et al., 2005). No entanto, também há evidências de que esta suplementação não melhora o controle destas crises (Bromfield et al., 2008). Em um recente estudo, *in vivo*, Willis et al. (2009) não verificaram atividade anti-convulsivante, em modelo experimental de convulsão induzida por ácido caínico, fluorotil ou PTZ após suplementação com DHA e EPA incorporado na ração dos

animais. Outros estudos foram realizados com uma mistura de ALA (C18: 3n-3) e LA (C18:3n-6) (proporção de 1:4), o composto SR-3, que apresentou atividade anticonvulsivante em modelo experimental de convulsão induzida por PTZ (Yehuda et al., 1994; Rabinovitz et al., 2004; Taha et al., 2006; Taha et al., 2009b). Yehuda et al. (1994) teve seus resultados ratificados por Rabinovitz et al. (2004), afirmando que a administração de SR-3 aumentou a latência e reduziu a duração das convulsões induzidas por PTZ. Já Taha et al. (2009b), somente obteve os mesmos resultados usando uma dose cinco vezes superior. Xiao & Li (1999) demonstraram que a incubação de fatias de hipocampo com EPA e DHA reduz a frequência de evocação de potenciais de ação e aumenta o limiar de estimulação de neurônios da região CA1 do hipocampo. A administração de uma única dose de ALA (C18: 3n-3), em ratos, impede o aparecimento de convulsões induzidas por ácido caínico e a consequente perda neuronal (Lauritzen et al., 2000; Blondeau et al., 2002).

Embora seja difícil determinar as razões para tais discrepâncias, há diferenças metodológicas importantes entre estes estudos, por exemplo, o tipo e a duração do tratamento, doses e vias de administração e, desenho experimental (Taha et al., 2009a).

É sabido que a deficiência de AGPI n-3 pode afetar a atividade de canais iônicos e de enzimas como a Na^+, K^+ -ATPase, interferindo na transdução de sinal e, ainda, modificar a afinidade de receptores de diferentes neurotransmissores em neurônios (Horrocks & Farooqui, 2004).

Embora o mecanismo molecular de atuação do DHA sobre os canais iônicos não esteja completamente elucidado (Horrocks & Farooqui, 2004), sabe-se que disparos repetidos de potenciais de ação podem ser inibidos pelo bloqueio de canais de Ca^{++} e Na^+ voltagem-dependentes (Itokazu et al., 2000).

Contudo, não há relatos na literatura se o tratamento crônico com AG nas convulsões induzidas por MMA. Desta forma, esta avaliação é necessária na determinação de novos alvos terapêuticos para a acidemia metilmalônica.

4 CAPÍTULO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito (seção 4.1), que foi submetido para publicação na revista *Epilepsia*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no mesmo.

4.1. Manuscrito

“Óleo de peixe atenua as convulsões induzidas por metilmalonato”

Fish oil attenuates methylmalonate-induced seizures

Cristina R. Banderó^{1,2} Mirian G.S.S. Salvadori²; Anajara T. Gomes²;
Nadja Dal Ri²; Mauro Schneider Oliveira^{1,2,3};
Leonardo Magno Rambo²; Fulvio A. Scorza⁴; Roberta M. Cysneiros⁵;
Carlos Fernando de Mello^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, CCS,

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCS,

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

³Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Itaqui, RS, Brasil

⁴Disciplina de Neurologia Experimental

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

⁵Programa de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde,

Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil

* Corresponding author: Dr. Carlos Fernando de Mello

Dep. Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

97105-900, Santa Maria, RS, BRAZIL.

FAX: +55 55 3220 9378

e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

mello.cf@gmail.com (alternative)

Summary

Purpose: Methylmalonic acidemias are inherited metabolic disorders characterized by methylmalonate (MMA) accumulation and neurological dysfunction, including seizures. Dietary fatty acids are known as an important energy source and reduce seizure activity in selected acute animal models. This study investigates whether the chronic treatment with fish oil or with oleic acid attenuates MMA-induced seizures.

Methods: Adult male Wistar rats were given fish oil (85 mg/kg), oleic acid (85 mg/kg) or vehicle (0.42 % aqueous Cremophor EL™, 4 mL/kg/body weight/day), p.o., for 75 days. In the 73th day were implanted a cannula in the right lateral ventricle with electrodes over the parietal cortex for EEG recording. In the 76th day half the animals from each group were injected with NaCl (2.5 μmol/2.5 μL, i.c.v.), and the other half with MMA (2.5 μmol/2.5 μL, i.c.v.), and seizure activity was measured by EEG recording with concomitant behavior monitoring. The effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) on Na⁺,K⁺-ATPase activity of slices of cerebral cortex from NaCl-injected (control) animals was determined.

Results: Fish oil administration increased the latency for MMA-induced tonic-clonic seizures and reduced the mean amplitude of ictal EEG recordings. Oleic acid decreased mean amplitude of ictal EEG recordings. Only the treatment with fish oil prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺, K⁺ - ATPase activity in cortical slices *in vitro*.

Discussion: The results support a major anticonvulsant role for fish oil against MMA-induced seizures. The decreased sensitivity of Na⁺,K⁺-ATPase from fish oil-treated animals to the inhibitory effect of PGE₂ may be related to its currently reported anticonvulsant activity.

Key words: methylmalonate; seizure; fatty acid; fish oil; oleic acid

Introduction

Dietary fatty acids are known as an important energy source. However, the primary functions of free fatty acids and complex lipids extends to other biological functions, including structural function in membranes, receptor ligands, second messengers, immunomodulators, within others, resulting in cognitive, neurophysiological, and behavioral changes (Yehuda, et al. 1999).

Fish oil is a common source of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), being particularly rich in eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3) (Duda, et al. 2007). DHA is the most abundant n-3 PUFA of the brain (Dyall & Michael-Titus 2008), being particularly important for the structural integrity of neuronal and non-neuronal membranes (Bourre, et al. 1991). Interestingly, fish oil has been suggested to increase life span, at least in part due to its cardiac antiarrhythmic properties which decreases the risk for cardiovascular events, ischemic heart disease and sudden death (Leaf 2001, Lee, et al. 2009, Lichtenstein, et al. 2006, von Schacky & Harris 2007). In addition, PUFAs have significant anti-inflammatory (Calder 2006, Mori & Beilin 2004) and anti-thrombotic effects (Blok, et al. 1996, Engstrom, et al. 2001), through the modulation of prostaglandin, leukotriene and cytokine pathways.

It has been suggested that n-3 PUFAs may directly influence neuronal activity, since a deficiency of these fatty acids alters cell homeostasis by decreasing Na^+, K^+ -ATPase (EC 3.6.3.9) activity, a crucial enzyme for ionic gradient maintenance (Gerbi, et al. 1999). In fact, the administration of a single dose of alpha-linolenic acid (ALA; C18:3n-3) prevents kainic acid-induced seizures and neuronal loss in hippocampus of rats (Blondeau, et al. 2002, Lauritzen, et al. 2000). Moreover, a mixture of alpha-linolenic and linoleic acids (ratio of 1:4), decreases pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures (Rabinovitz, et al. 2004, Taha, et al. 2006, Taha, et al. 2009b, Yehuda, et al. 1994), supporting the view that n-3 PUFAs decrease seizures. However, it was recently reported that DHA and EPA supplementation in the diet does not change the threshold for fluorothyl-, PTZ-, kainic acid-, or 6 Hz current-induced convulsions in mice (Willis, et al. 2009).

In what concerns the effect of n-3 PUFAs supplementation in the clinics, there are reports that these substances prevent seizures in epileptic patients (Schlanger, et al. 2002, Yuen, et al. 2005), although there is also a report that n-3 PUFA supplementation does not improve seizure control (Bromfield, et al. 2008). While it is difficult to determine the reasons for such a discrepancy, there are methodological differences in these studies that may account

for it, including type and duration of treatment, doses and routes of administration, and experimental design (Taha, et al. 2009a).

Oleic acid is a predominant component of olive oil and of the Mediterranean diet (Trichopoulou & Critselis 2004). It is a monounsaturated n-9 fatty acid (OA; C18:1n-9) that is converted to eicosatrienoic acid (ETA; C20:3n-9) by $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases and elongases. ETA effectively inhibits LTB₄ synthesis, decreasing inflammatory response (Evans, et al. 1985, James, et al. 2000, Stenson, et al. 1984). In addition, oleic acid was reported to either have no effect (Zhu & Smart 2005) or inhibit endothelial NO synthase, decreasing the production of this inflammatory mediator (Davda, et al. 1995, Kuroda, et al. 2001). However, no study has addressed whether oleic acid decreases neuroinflammation or associated neurological dysfunctions, such as seizures.

Methylmalonic acidemias are inherited metabolic disorders characterized by accumulation of methylmalonate (MMA) in tissue and body fluids, due a deficiency of the enzyme methylmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2). The affected infants who survive longer present a variable degree of mental retardation and severe neurological dysfunction, including seizures (Fenton 2001). The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the convulsive behavior elicited by MMA has been suggested (Royes, et al. 2007) since MMA-induced seizures are attenuated by the antioxidants α -tocopherol, ascorbic acid and GM1 ganglioside (Figuera, et al. 2003, Figuera, et al. 1999) and increased by pro-oxidants, such as ammonia (Marisco, et al. 2003).

Although accumulating evidence suggests that antioxidants and anti-inflammatory treatment (unpublished observations) may decrease MMA-induced seizures, no study has addressed whether dietary supplementation with fish oil and oleic acid alters the seizures induced by MMA.

Materials and methods

Animals and Reagents

Forty-eight adult male Wistar rats, weighing on average 201 ± 26.2 g at the beginning and 330 ± 32.7 g at the end of the experimental period, were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (SupraTM, Santa Maria, Brazil) and water. The rat chow

was submitted to gas chromatography analysis to evaluate the fatty acids components. All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals — PHS Policy), and with the approval of the Ethics and Animal Welfare Committee Research of the Federal University of Santa Maria.

Oleic acid was obtained from Synth (Sao Paulo, Brazil), and CremophorTM EL was purchased from Basf (Germany). Fish oil was extracted from commercially available capsules (ProepaTM, Aché Laboratories, Brazil) and also was submitted to gas chromatography analysis. All the other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Gas chromatography analysis

Samples were saponified in methanolic KOH solution and esterified in methanolic H₂SO₄ solution (Hartman & Lago 1973). Methylated fatty acids were analyzed using an Agilent Technologies Gas Chromatograph (HP 6890) equipped with a HP-INNOWax capillary column (polyethylene glycol, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) and flame ionization detector. The injector port was set at 250°C and the carrier gas was nitrogen (0.9 mL/min). After injection (1 µL, split ratio 50:1), the oven temperature was increased from 120°C to 250°C at 20°C/min and held at 250°C for 13.5 min. Standard fatty acid methyl esters (Sigma, Saint Louis, USA) were subjected to the same conditions and their retention times were used to identify the fatty acids. Results were expressed as percentage of the total area of the identified fatty acids.

Treatment

Animals were initially divided into three groups (n = 16 in each group), at random: (1) control, daily treated with vehicle (0.42% aqueous CremophorTM EL, v/v); (2) Fish oil, daily treated with a solution of 2.12% fish oil (w/v in vehicle); (3) Oleic acid, daily treated with a solution of 2.12% oleic acid (w/v in vehicle). All solutions were administrated by gavage (p.o.) at the dose 4 mL/kg body weight/day (Ferrari, et al. 2008) for 75 days. The weight of the animals was monitored daily.

Surgical procedures

In the seventy-third day of treatment the animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol, 3 mL/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was inserted unilaterally into the right lateral ventricle (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 1.5 mm, V 2.5 mm from the dura) (Paxinos & Watson 1986). Chloranphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. Two screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Intracerebroventricular infusions were carried out by a guide cannula, which was glued to a multipin socket, and inserted through a previously opened skull orifice. The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the guide cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement.

EEG recordings and susceptibility to MMA-induced seizures

In the 76th day (twenty-four hours after treatment completion), susceptibility to MMA-induced seizures was assessed. The procedures for EEG recording and intracerebroventricular injection of drugs were carried out as previously described (Paulson, et al. 2000). Briefly, the animals were allowed to habituate to a Plexiglas cage (25 x 25 x 60 cm) for at least 10 min before EEG recording. The rats were then connected to the lead socket of a swivel, which was connected to digital encephalographic equipment (Neuromap EQSA260, Neurotec, Brazil) inside a Faraday's cage. Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis, as described below. Half of animals from each group were injected with NaCl (2.5 μ mol/2.5 μ L, i.c.v.), and the other half with MMA (2.5 μ mol/2.5 μ L, i.c.v.), to induce seizures. All drugs were injected over 1-min period by using a Hamilton syringe, and an additional minute was allowed to elapse before removal of needle to avoid backflow of the drug through the cannula. Drug doses and time of administration were based on pilot experiments. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads: spikes (≥ 2 X baseline) plus slow waves; multispikes (≥ 2 X baseline, ≥ 3 spikes/complex)

plus slow waves or major seizure (repetitive spikes plus slow waves, ≥ 5 sec). Rhythmic scratching of the electrode headset rarely caused artifacts, which were easily identified and discarded.

Na⁺, K⁺ - ATPase activity measurements

Since Na⁺, K⁺-ATPase activity deficiency has been associated to seizures (Jurkat-Rott, et al. 2004), and this enzyme has recently been identified as a target for PGE₂ in the brain (Oliveira, et al. 2009), the effect of chronic treatment with fatty acids on basal and on PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured. After the EEG recordings the animals injected with 2.5 μ mol NaCl (control) were killed by decapitation and the cerebral cortex was dissected. Slices (400 μ m thick) were prepared with a McIlwain tissue chopper and maintained in a pre-gassed (carbogen) aCSF containing (in mM): 1.25 NaH₂PO₄; 22 NaH₂CO₃; 1.8 MgSO₄; 129.0 NaCl; 1.8 CaCl₂; 3.5 KCl; 10 D-glucose, and pH was adjusted to 7.4 with carbogen. Slice viability was assessed at 0, 30, 60 and 90 min after preparation by measuring lactate dehydrogenase release by using a standard commercial kit (Labtest™, Brazil). Cortical slices were viable for more than 60 min after preparation, and all experiments were performed within this time window (data not shown). Slices were incubated with PGE₂ (1 μ M) or vehicle (aCSF) for 30 min at 37 °C, as described by Oliveira et al. (2009). After the incubation period, the medium was discarded and slices were gently homogenized (7 – 10 strokes) in ice-cold 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) for Na⁺,K⁺-ATPase activity determination (Wyse, et al. 2000). Briefly, the assay medium consisted of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂ and 50 μ g of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM). The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (Tris salt) to a final concentration of 5 mM. After 30 min, the reaction was stopped by the addition of 70 μ L of 50 % (w/v) trichloroacetic acid. Appropriate controls were included in the assay for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), using KH₂PO₄ as reference standard. Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

Statistical analyses

Latencies for partial (myoclonic jerk, accompanied by EEG alteration) and for tonic-clonic seizures were analyzed by Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA followed by the nonparametric Dunn’s multiple comparison test and presented as median and interquartile ranges. The mean amplitude of EEG recordings, total time spent in tonic-clonic seizures and the Na^+, K^+ -ATPase activity were analyzed by parametric one- or two-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test and expressed as mean + S.E.M.. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and H and F values are shown only if $P < 0.05$.

Results

Fatty acid composition of standard rat chow and fish oil

The fatty acid composition of the rat chow was as follows: 4.5 % of total fat, being saturated fatty acids (25.4 %), oleate (33.1 %), other monounsaturated fatty acids (1.2 %), linoleate (37.3 %), and α -linolenate (2.9 %). The fatty acid composition of fish oil capsules was as follows: EPA (19.8 %), DHA (12.3 %), oleate (15.2 %), other monounsaturated fatty acids (13.3 %), and saturated fatty acids (39.4 %), confirming the specifications of the manufacturer (Aché Laboratories, Brazil).

Evaluation of susceptibility to MMA-induced seizures

Since the animals were subjected to a long-term treatment, the effect of fatty acids on weight gain was evaluated along time. Fish oil and oleic acid supplementation did not alter weight gain ($P > 0.05$, data not shown).

Figure 1 shows the effect of fish oil and oleic acid on MMA (2.5 $\mu\text{mol}/2.5 \mu\text{L}$, i.c.v.)-induced seizures, measured as latency for myoclonic jerks (first behavioral manifestation of seizures) accompanied by EEG alteration (A), and for generalized tonic-clonic seizures (B). Statistical analysis revealed that the fish oil increased latency for generalized tonic-clonic seizures [$H(2) = 7.730$; $P < 0.03$; Fig 1B], but did not alter the latency for myoclonic jerks (Fig 1A). Oleic acid (4 mL/Kg, p.o., daily), on the other hand, did not alter MMA-induced seizures ($P > 0.05$).

Representative EEGs showing MMA-induced seizures and the anticonvulsant effect of fish oil are presented in Figure 2. Baseline EEG recordings are shown in the figures 2A, 2C and 2E, and were not altered by fish oil or oleic acid treatment. The injection of MMA caused the appearance of multispike plus slow waves and major seizure activity (Fig 2B). Multispike plus slow waves coincided with myoclonic jerks. Generalized convulsions appeared in the electroencephalographic recordings as the major seizure activity, and were characterized by 2-3 Hz high-amplitude activity. After the ictal discharge, postictal EEG suppression and slow waves were observed, correlating with behavioral catalepsy. In addition, EEG recordings confirmed that fish oil increased the latency for MMA-induced generalized tonic-clonic seizures (Fig 2D) and that oleic acid did not alter the seizures induced by MMA (Fig 2F).

Quantitative analysis of EEG recordings revealed that treatment with fatty acids decreased the mean amplitude (in μV) of EEG recordings of MMA-induced seizures. Seizure episodes were considered less severe in the animals that received fish oil and oleic acid in comparison with vehicle [$F(2,20) = 7.04$; $P < 0.01$], since mean amplitude of ictal EEG recordings was significantly decreased in these groups (Figure 3).

Na⁺,K⁺-ATPase activity

Figure 4 shows the Na⁺,K⁺-ATPase activity on cortical slices, to evaluate whether the chronic treatment with fatty acids would alter the inhibitory effect of PGE₂ on pump activity. The supplementation with fish oil (4 mL/kg, p.o.) and oleic acid (4 mL/kg, p.o.) did not alter the Na⁺,K⁺-ATPase activity on cortex of treated animals ($P > 0.05$). The incubation with PGE₂ decreased the Na⁺,K⁺-ATPase activity in cortical slices of vehicle [$F(2,21) = 3.78$; $P < 0.01$] and oleic acid groups [$F(2,21) = 4.10$; $P < 0.01$], but not in slices obtained from fish oil-treated animals ($P > 0.05$).

Discussion

In the present study we showed that chronic treatment with fish oil attenuates MMA-induced seizures, measured by the increased latency for tonic-clonic episodes and the reduced mean amplitude of ictal EEG recordings. Oleic acid did not alter the latency for seizures, but decreased the mean amplitude of ictal EEG recordings. In addition, this study shows that

chronic treatment with fish oil *in vivo* renders slices of cerebral cortex more resistant to PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity *in vitro*.

The elevated consumption of fish oil results in an increased proportion of n-3 PUFAs in membrane phospholipids (Calder 2006, Serhan, et al. 2003). EPA competes with arachidonic acid for COX and LOX (Calder 2006), decreasing the synthesis of proinflammatory eicosanoids, such as PGE₂ (Trebbles, et al. 2003), TXA₂ (Caughey, et al. 1996), LTB₄ (Lee, et al. 1985). In addition, EPA gives rise to a different family of eicosanoids: the 5-series leukotrienes (LTB₅ e LTE₅) and the 3-series prostaglandins and tromboxanes (Calder 2006), which are less active as inflammatory agents than arachidonic acid derivatives. Oleic acid is converted to ETA (n-9), which is also a substrate for 5-LOX, producing LTA₃. This leukotriene decreases LTB₄ synthesis by inhibiting LTA₄ hydrolase, in the arachidonic acid cascade (Jakschik, et al. 1983, James, et al. 2000). The inhibition of this pathway has been observed in rats (Stenson, et al. 1984) and humans (Cleland, et al. 1994) during essential fatty acids restriction, leading to elevated ETA (n-9) concentrations and inhibition of inflammatory response.

Accumulating evidence suggests a role for inflammatory mediators and Na⁺,K⁺-ATPase in seizure development (Vezzani 2005). Accordingly, it has been shown that while monoclonal antibodies anti-PGE₂ attenuates, the injection of PGE₂ facilitates PTZ-induced (Oliveira, et al. 2008b) and MMA-induced (unpublished observations) seizures. Interestingly, PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus of rats (Oliveira, et al. 2009), and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition has been associated to seizure development (Jamme, et al. 1995). The current finding that chronic treatment with fish oil *in vivo* renders slices of cerebral cortex more resistant to PGE₂-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase *in vitro* is particularly interesting. It suggests that a component of fish oil may: 1) activate or generate a metabolite that competes with PGE₂ for EP1, EP3 or EP4 receptors, whose activation decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity (Oliveira, et al. 2008a); 2) activate or generate a metabolite that triggers EP2 receptors, whose activation increases Na⁺,K⁺-ATPase activity (Oliveira, et al. 2009); 3) induce EP1, EP3 or EP4 receptor desensitization or attenuation of coupled mechanisms; 4) induce EP2 receptor sensitization or facilitation of EP2-coupled mechanisms.

Notwithstanding, PUFAs may decrease inflammation by mechanisms independent of decreased eicosanoid production (Calder 2006). In line with this view, EPA and DHA decrease IL-1β, TNF-α (Chu, et al. 1999), IL-6 and IL-8 production in *in vitro* and *ex vivo* (Calder 2006, De Caterina, et al. 1994, Khalifoun, et al. 1997). Since increased IL-1β, TNF-α

and IL-6 brain levels have been causally linked to seizures (Vezzani 2008), it is also plausible that the currently reported protective effect of fish oil against MMA-induced seizures could occur via inhibition of cytokines production and release. Since in the current study we did not evaluate the effect of fish oil on cytokine levels, this possibility awaits further investigation.

It is worth remarking that n-3 PUFAs decrease Na^+ (Xiao, et al. 1995, Young, et al. 2000) and Ca^{++} currents in rat hippocampus (Vreugdenhil, et al. 1996, Xiao, et al. 1997). It is known that DHA accelerates Na^+ -channel inactivation and slows down the recovery from inactivation. These effects of PUFAs on Na^+ currents would reduce the ability of neurons to fire from relatively depolarized levels, increase their refractory period, and reduce the maximal firing rate (Vreugdenhil, et al. 1996, Young, et al. 2000). Furthermore, it has also been suggested that DHA causes an electrostatic effect on the Na^+ channel voltage sensor, decreasing its sensitivity (Borjesson, et al. 2008). As regards the K^+ channels, n-3 fatty acids affect the concerted opening step and, to less degree, the early transitions during channel activation (Borjesson, et al. 2008). In addition, it has been shown that K^+ channels are activated by PUFA (Ordway, et al. 1995, Rouzair-Dubois, et al. 1991). Therefore, it is not possible to rule out a direct action of a fish oil component on ionic channels as the mechanism of the currently described anticonvulsant effect of this agent.

It is also worth pointing out that long-term treatment with long-chain n-3 fatty acids decreases neuronal death in CA1 and CA3 subfields of the rat hippocampus (Ferrari, et al. 2008). This neuroprotection could enhance GABAergic transmission and reduce seizure susceptibility, since n-3 PUFA decreases GABAergic cell loss in animals with pilocarpine-induced epilepsy (Andre, et al. 2001, Vreugdenhil, et al. 1996).

In summary, our data demonstrate that the long-term treatment with fish oil attenuates MMA-induced seizures. This finding is consistent with the view that PUFAs have anticonvulsant activity (Taha, et al. 2010), and that increasing the intake of these fatty acids may be particularly beneficial to methylmalonic acidemic patients, for whom PUFA supplementation has been reported to decrease triglycerides without causing adverse effects (Aldamiz-Echevarria, et al. 2006). However, more studies are necessary to clarify the mechanisms by which fish oil decreases seizures.

Acknowledgements

Work supported by CNPq (research grant #476551/2009-9) and CAPES. C.R. Banderó, L.M. Rambo, M.S. Oliveira and C.F. Mello are recipients of CNPq fellowships (research fellowships #552898/2008-2, #141164/2010-7, #150905/2009-2 and #301552/2007-0, respectively). None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Figure 1

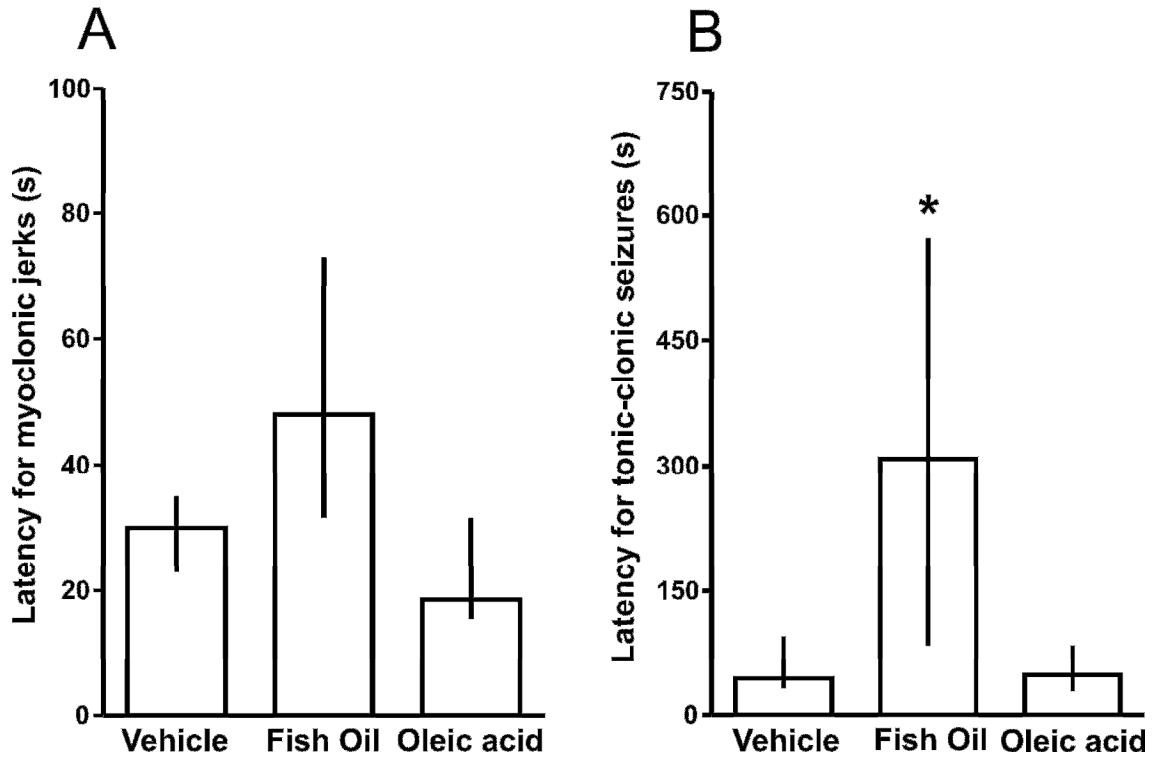


Figure 1- Effect of fish oil on the latency for myoclonic jerks (A), and tonic-clonic seizures (B) induced by MMA (2.5 μmol/2.5 μL, i.c.v.). Data are presented in seconds, as median and interquartile range, for $n = 8$ in each group. * Indicates a significant difference compared with the control group ($P < 0.05$).

Figure 2

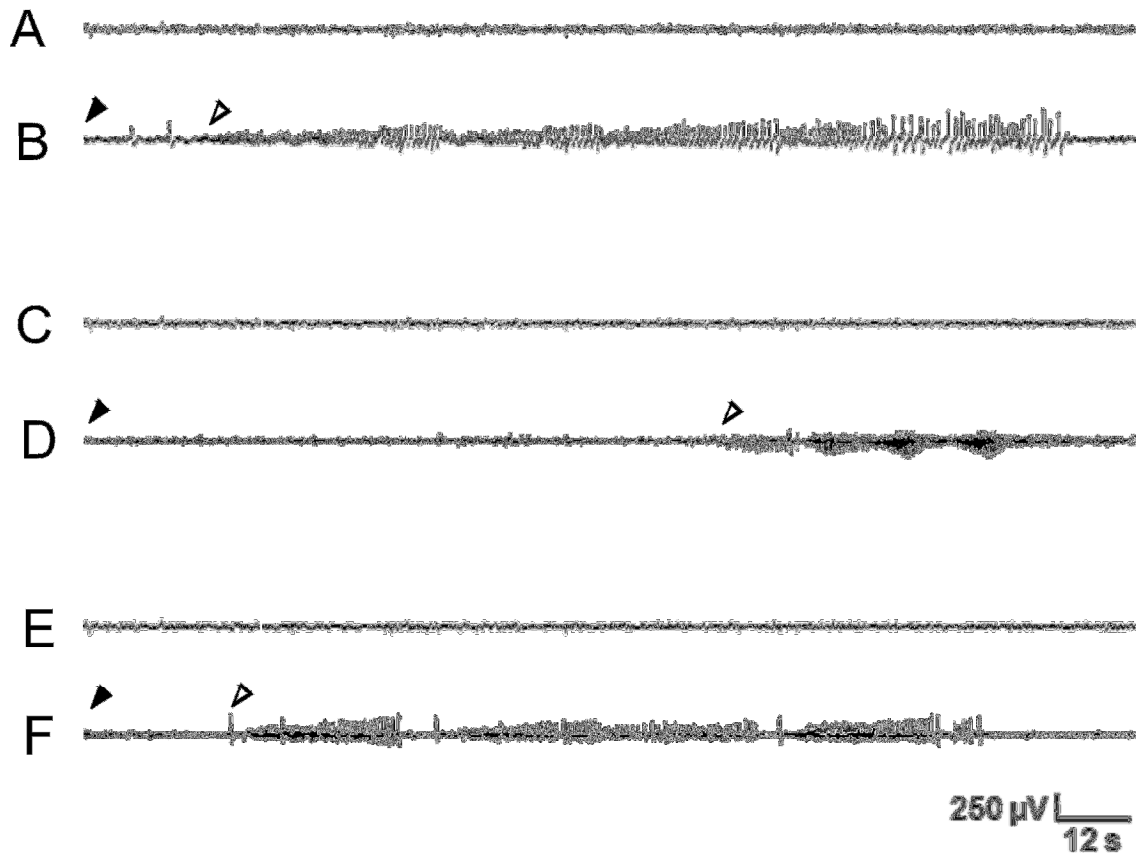


Figure 2 – Representative electroencephalographic recordings from the parietal cortex (CTX) of animals that received vehicle (A-B), fish oil (C-D) or oleic acid (E-F), showing that fish oil (D) increased latency for seizures and reduced mean amplitude of ictal events. Oleic acid (F) reduced mean amplitude of ictal events. Black and white arrows indicate MMA injection and beginning of seizures, respectively.

Figure 3

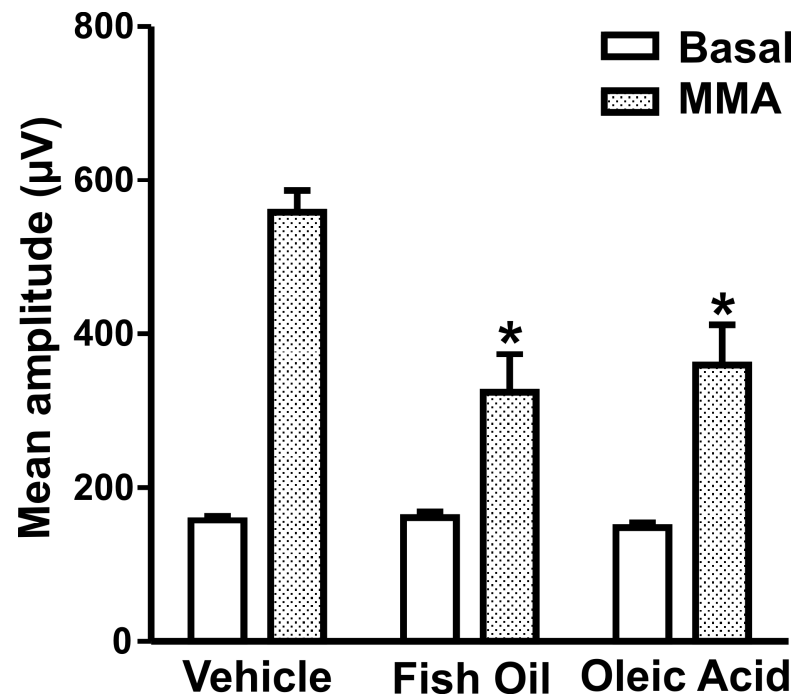


Figure 3 – Effect of fish oil or oleic acid on the mean amplitude of EEG recordings in the parietal cortex of animal injected with MMA (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.). N = 8 in each group. * $P < 0.05$, when compared with respective vehicle (Mean + S.E.M.).

Figure 4

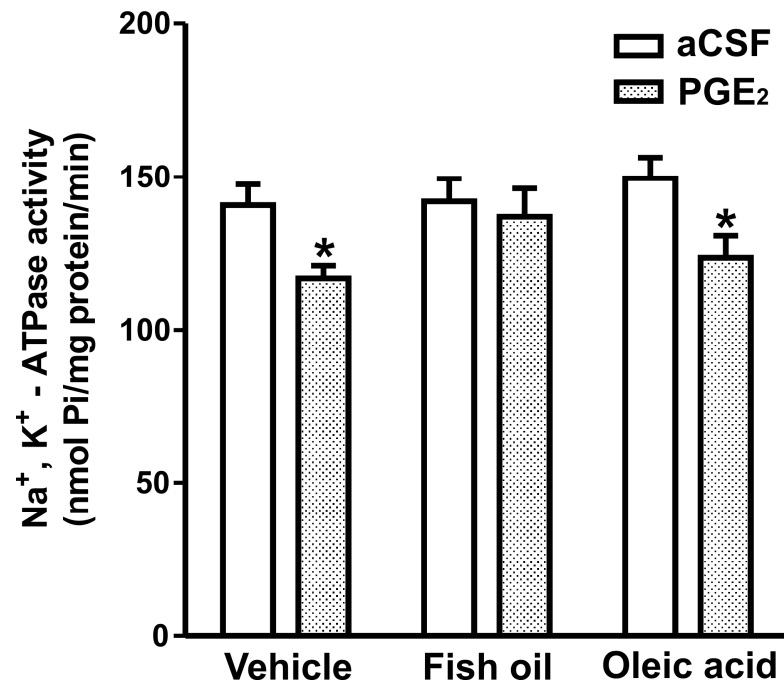


Figure 4 – Fish oil prevents PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in cortical slices. Data are presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for $n = 8$ in each group. * Indicates a significant difference compared with the control group ($P < 0.05$).

References

- Aldamiz-Echevarria L, Sanjurjo P, Elorz J, Prieto JA, Perez C, Andrade F, Rodriguez-Soriano J. (2006) Effect of docosahexaenoic acid administration on plasma lipid profile and metabolic parameters of children with methylmalonic acidaemia. *J Inherit Metab Dis* 29:58-63.
- Andre V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM. (2001) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:452-468.
- Blok WL, Katan MB, van der Meer JW. (1996) Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *J Nutr* 126:1515-1533.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. (2002) Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 109:231-241.
- Borjesson SI, Hammarstrom S, Elinder F. (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophys J* 95:2242-2253.
- Bourre JM, Dumont O, Piciotti M, Clement M, Chaudiere J, Bonneil M, Nalbone G, Lafont H, Pascal G, Durand G. (1991) Essentiality of omega 3 fatty acids for brain structure and function. *World Rev Nutr Diet* 66:103-117.
- Bromfield E, Dworetzky B, Hurwitz S, Eluri Z, Lane L, Replansky S, Mostofsky D. (2008) A randomized trial of polyunsaturated fatty acids for refractory epilepsy. *Epilepsy Behav* 12:187-190.
- Calder PC. (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505S-1519S.
- Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. (1996) The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 63:116-122.
- Chu AJ, Walton MA, Prasad JK, Seto A. (1999) Blockade by polyunsaturated n-3 fatty acids of endotoxin-induced monocytic tissue factor activation is mediated by the depressed receptor expression in THP-1 cells. *J Surg Res* 87:217-224.
- Cleland LG, James MJ, Proudman SM, Neumann MA, Gibson RA. (1994) Inhibition of human neutrophil leukotriene B4 synthesis in essential fatty acid deficiency: role of leukotriene A hydrolase. *Lipids* 29:151-155.

- Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. (1995) Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 26:764-770.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Jr., Libby P. (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 14:1829-1836.
- Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, Hoit BD, Kop WJ, Stanley WC. (2007) Dietary supplementation with omega-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res* 76:303-310.
- Dyall SC, Michael-Titus AT. (2008) Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med* 10:219-235.
- Engstrom K, Wallin R, Saldeen T. (2001) Effect of low-dose aspirin in combination with stable fish oil on whole blood production of eicosanoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:291-297.
- Evans JF, Nathaniel DJ, Zamboni RJ, Ford-Hutchinson AW. (1985) Leukotriene A3. A poor substrate but a potent inhibitor of rat and human neutrophil leukotriene A4 hydrolase. *J Biol Chem* 260:10966-10970.
- Fenton WG, RA; Rosenblatt DS. (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle, D, (ed) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York, pp. 2165–2193.
- Ferrari D, Cysneiros RM, Scorza CA, Arida RM, Cavalheiro EA, de Almeida AC, Scorza FA. (2008) Neuroprotective activity of omega-3 fatty acids against epilepsy-induced hippocampal damage: Quantification with immunohistochemical for calcium-binding proteins. *Epilepsy Behav* 13:36-42.
- Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JB, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF. (2003) GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35:465-473.
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, Gonzalez-Rodriguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF. (1999) Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 10:2039-2043.

-
- Gerbi A, Zerouga M, Maixent JM, Debray M, Durand G, Bourre JM. (1999) Diet deficient in alpha-linolenic acid alters fatty acid composition and enzymatic properties of Na⁺, K⁺-ATPase isoenzymes of brain membranes in the adult rat. *J Nutr Biochem* 10:230-236.
- Hartman L, Lago RC. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22:475-476 passim.
- Jakschik BA, Morrison AR, Sprecher H. (1983) Products derived from 5,8,11-eicosatrienoic acid by the 5-lipoxygenase-leukotriene pathway. *J Biol Chem* 258:12797-12800.
- James MJ, Gibson RA, Cleland LG. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 71:343S-348S.
- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333-337.
- Jurkat-Rott K, Freilinger T, Dreier JP, Herzog J, Gobel H, Petzold GC, Montagna P, Gasser T, Lehmann-Horn F, Dichgans M. (2004) Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology* 62:1857-1861.
- Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. (1997) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol* 400B:589-597.
- Kuroda R, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. (2001) Unsaturated free fatty acids inhibit Ca²⁺ mobilization and NO release in endothelial cells. *Kobe J Med Sci* 47:211-219.
- Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *Embo J* 19:1784-1793.
- Leaf A. (2001) The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of n-3 polyunsaturated fatty acids: heart and brain. *Lipids* 36 Suppl:S107-110.
- Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS. (2009) Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol* 6:753-758.
- Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, 3rd, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. (1985) Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 312:1217-1224.
- Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. (2006) Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a

-
- scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114:82-96.
- Marisco PC, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mello CF. (2003) Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol* 182:455-460.
- Mori TA, Beilin LJ. (2004) Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 6:461-467.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF. (2008a) Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 152:1110-1118.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF. (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416-426.
- Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavalheiro EA, Mello CF. (2008b) Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79:14-21.
- Ordway RW, Petrou S, Kirber MT, Walsh JV, Jr., Singer JJ. (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K⁺ channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol* 484 (Pt 2):331-337.
- Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, Lawal YM, Cogburn JN, Gresk CJ, Markos CS, Maziasz TJ, Schoenhard GL, Burton EG. (2000) Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 28:514-521.
- Paxinos G, Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney ; Orlando.
- Rabinovitz S, Mostofsky DI, Yehuda S. (2004) Anticonvulsant efficiency, behavioral performance and cortisol levels: a comparison of carbamazepine (CBZ) and a fatty acid compound (SR-3). *Psychoneuroendocrinology* 29:113-124.
- Rouzair-Dubois B, Gerard V, Dubois JM. (1991) Modification of K⁺ channel properties induced by fatty acids in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch* 419:467-471.
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Petry JC, Coelho RC, Mello CF. (2007) The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by

-
- methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. *Epilepsy Res* 73:228-237.
- Schlanger S, Shinitzky M, Yam D. (2002) Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia* 43:103-104.
- Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, Colgan SP, Stahl GL, Merched A, Petasis NA, Chan L, Van Dyke TE. (2003) Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 171:6856-6865.
- Stenson WF, Prescott SM, Sprecher H. (1984) Leukotriene B formation by neutrophils from essential fatty acid-deficient rats. *J Biol Chem* 259:11784-11789.
- Taha AY, Baghiu BM, Lui R, Nylen K, Ma DW, Burnham WM. (2006) Lack of benefit of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on seizure latency, duration, severity or incidence in rats. *Epilepsy Res* 71:40-46.
- Taha AY, Burnham WM, Auvin S. (2010) Polyunsaturated fatty acids and epilepsy. *Epilepsia*.
- Taha AY, Ciobanu FA, Saxena A, McIntyre Burnham W. (2009a) Assessing the link between omega-3 fatty acids, cardiac arrest, and sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav* 14:27-31.
- Taha AY, Filo E, Ma DW, McIntyre Burnham W. (2009b) Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. *Epilepsia* 50:72-82.
- Trebbles TM, Wootton SA, Miles EA, Mullee M, Arden NK, Ballinger AB, Stroud MA, Burdge GC, Calder PC. (2003) Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am J Clin Nutr* 78:376-382.
- Trichopoulos A, Critselis E. (2004) Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev* 13:453-456.
- Vezzani A. (2005) Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Curr* 5:1-6.
- Vezzani AP, J; Janigro, D. (2008) Inflammation. In Engel Jr JaP, TA, (ed) *Epilepsy a Comprehensive Textbook*. Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 267-276.
- von Schacky C, Harris WS. (2007) Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res* 73:310-315.

-
- Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Wadman WJ. (1996) Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12559-12563.
- Willis S, Samala R, Rosenberger TA, Borges K. (2009) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are not anticonvulsant or neuroprotective in acute mouse seizure models. *Epilepsia* 50:138-142.
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M. (2000) Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331-2334.
- Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. (1997) Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4182-4187.
- Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A. (1995) Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11000-11004.
- Yehuda S, Carasso RL, Mostofsky DI. (1994) Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. *Eur J Pharmacol* 254:193-198.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. (1999) Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res* 56:565-570.
- Young C, Gean PW, Chiou LC, Shen YZ. (2000) Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. *Synapse* 37:90-94.
- Yuen AW, Sander JW, Fluegel D, Patsalos PN, Bell GS, Johnson T, Koepp MJ. (2005) Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: a randomized trial. *Epilepsy Behav* 7:253-258.
- Zhu W, Smart EJ. (2005) Myristic acid stimulates endothelial nitric-oxide synthase in a CD36- and an AMP kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 280:29543-29550.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que o tratamento crônico com óleo de peixe atenua as convulsões induzidas por MMA. Este efeito anticonvulsivante foi verificado pelo aumento da latência para os episódios convulsivos tônico-clônicos e pela redução da amplitude média dos registros de EEG ictais (durante as crises convulsivas). Em contrapartida, o ácido oléico não alterou a latência para as convulsões, porém, diminuiu a amplitude média dos registros de EEG ictais. Além disso, este estudo mostrou que o tratamento crônico com óleo de peixe *in vivo* preveniu a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 , *in vitro*.

O consumo elevado de óleo de peixe resulta em um aumento da proporção de AGPI n-3 nos fosfolipídios de membrana (Serhan et al. 2003; Calder, 2006). Como já descrito anteriormente, o EPA compete enzimaticamente com o AA nas vias da COX e LOX (Calder, 2006), diminuindo a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios, tais como PGE_2 (Trebble al., 2003). Neste contexto, o EPA origina mediadores menos inflamatórios ou “anti-inflamatórios”. Já o ETA (n-9), formado a partir do ácido oléico, principalmente durante a restrição de AGE, influencia indiretamente no processo inflamatório através da inibição da produção do LTB_4 (James et al., 2000).

Evidências sugerem o envolvimento mútuo de mediadores inflamatórios (Oliveira et al., 2008a) e da Na^+, K^+ -ATPase (Jamme et al., 1995, Oliveira et al., 2009) no desenvolvimento das convulsões (Vezzani, 2005). O fato do tratamento crônico com óleo de peixe *in vivo* prevenir a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro*, é particularmente interessante e suporta um papel protetor do óleo de peixe contra o efeito deletério da prostaglandina E_2 contra a Na^+, K^+ -ATPase. Assim, pode-se sugerir que algum componente do óleo de peixe possa: (1) ativar ou gerar um metabólito que venha a competir com a PGE_2 pelos receptores EP1, EP3 e EP4, cuja ativação diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Oliveira et al., 2008a); (2) ativar ou gerar um metabólito que estimule os receptores EP2, cuja ativação aumenta a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Oliveira et al., 2009); (3) induzir a dessensibilização dos receptores EP1, EP3 e EP4 ou a atenuação da atividade dos mecanismos pós-

receptor acoplados; (4) induzir a sensibilização dos receptores EP2 ou a facilitação da atividade dos mecanismos pós-receptor acoplados.

Não obstante, os AGPI n-3 podem diminuir a inflamação por mecanismos independentes da produção de eicosanóides (Calder, 2006), como a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (De Caterina et al., 1994; Khalfoun et al., 1997; Calder, 2006), a inibição da ativação do NF- κ B (Goua et al., 2008), e a diminuição na expressão de moléculas de adesão (De Caterina & Libby, 1996). O aumento dos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no cérebro tem sido relacionado ao desenvolvimento de crises convulsivas (Vezzani, 2008). É plausível que o efeito protetor verificado com o óleo de peixe possa ser mediado pela inibição da produção e/ou da liberação de citocinas. No presente estudo não foi avaliado o efeito do óleo de peixe sobre os níveis de citocinas, porém esta é uma possibilidade interessante para futuras investigações.

Os efeitos dos AGMI, como o ácido oléico, sobre a inflamação ainda não estão totalmente definidos. Há evidências de que o ácido oléico reduz a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (De Caterina & Libby, 1996), bem como um efeito inibitório sobre a ativação do NF- κ B (Carluccio et al., 1999). Porém, um efeito inibitório (Ciapaite et al., 2007) e nenhum efeito (Hennig et al. 2000) sobre o NF- κ B também foram descritos.

Os AGPI n-3 também atuam como moduladores de canais iônicos e, conseqüentemente, da transdução de sinal (Kitajka et al., 2002). Estes compostos diminuem as correntes de Na⁺ (Xiao et al., 1995; Young et al., 2000) e de Ca⁺⁺ em hipocampo de ratos (Vreugdenhil et al., 1996; Xiao et al., 1997), e aumentam as de K⁺, afetando principalmente a etapa da abertura (Borjesson et al., 2008). O DHA acelera a inativação dos canais de Na⁺, retarda a recuperação desta inativação, e ainda reduz o número de disparos de potencial de ação em fatias de hipocampo de ratos (Vreugdenhil et al., 1996; Young et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que o DHA exerce um efeito eletrostático sobre o sensor dos canais de Na⁺, diminuindo sua sensibilidade (Borjesson et al., 2008). Já os AGMI não alteram o limiar de disparo do potencial de ação e são praticamente ineficazes como moduladores dos canais de Na⁺, Ca⁺⁺ e K⁺ (Kang et al., 1995). Desta forma, é possível que um dos mecanismos envolvidos no efeito anticonvulsivante do óleo de peixe envolva a modulação de canais iônicos.

É importante ressaltar que o tratamento a longo prazo com AGPI n-3 diminui a morte neuronal nos subcampos CA1 e CA3 do hipocampo de ratos (Ferrari et al., 2008). Esta neuroproteção poderia aumentar a transmissão GABAérgica e reduzir a susceptibilidade às convulsões, uma vez que os AGPI n-3 diminuem a degeneração celular GABAérgica em animais com epilepsia induzida por pilocarpina (Vreugdenhil et al., 1996, Andre et al., 2001).

O entendimento dos mecanismos de indução e manutenção das convulsões é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias, tanto para a acidemia metilmalônica quanto para a epilepsia. Atualmente, o tratamento dos pacientes portadores de acidemia metilmalônica inclui medidas terapêuticas como: (1) remoção de toxinas através de transfusões de sangue ou hemodiálise; (2) restrição proteica (dieta isenta de aminoácidos valina, isoleucina, leucina, metionina e treonina); (3) terapia com vitamina B₁₂, nas acidemias metilmalônicas por deficiência deste cofator (Orgier de Baurny & Saudubray, 2002); (4) administração de L-carnitina, propiciando a excreção urinária de propionil-carnitina, reduzindo a toxicidade do propionato (Burns et al., 1996); (5) administração de metronidazol para reduzir a produção de propionato pela flora bacteriana (Leonard et al., 2001); (6) administração de ascorbato para diminuir os efeitos da deficiência de glutatona (Treacy et al., 1996). Neste ínterim, é interessante que o diazóxido, uma droga que ativa o canal de K⁺, é capaz de proteger tecidos isquêmicos e prevenir lesões celulares e teciduais provocadas por ácido metilmalônico (Kowaltowski et al., 2006).

Recentemente, Salvadori et al. (2010) verificaram que um inibidor seletivo da COX-2 (celecoxibe) é capaz de atenuar as convulsões induzidas por MMA, devido à inibição da produção de PGE₂. Porém, é importante ressaltar que inibição crônica da COX-2 também diminui a produção de PGI₂, o que leva a um aumento no número de eventos cardiovasculares fatais, o que impede o uso destes fármacos por períodos prolongados, particularmente em pacientes com outros fatores de risco para infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Marlett, 2009; Amer et al., 2010).

Sabe-se que os níveis de PGD₂ estão aumentados durante a fase latente e no período inter-ictal das crises convulsivas crônicas (Naffah-Mazzacoratti et al., 1995) induzidas por pilocarpina, e que tal prostaglandina apresenta atividade anticonvulsivante (Akarsu et al., 1998; Fostermann et al., 1998). Uma redução dos

níveis cerebrais de PGD_2 poderia aumentar a excitabilidade neuronal, facilitando o aparecimento de crises convulsivas (Akarsu et al., 1998; Forstermann et al., 1998). Como a inibição seletiva da COX-2 aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico para a COX-1 que, no cérebro, está acoplada funcionalmente à PGD_2 sintase, é possível que a ação anticonvulsivante dos coxibs ocorra pela divergência da via do ácido araquidônico, resultando numa alteração no balanço entre as ações da PGE_2 e PGD_2 , de certa forma análogo ao que propomos aqui como possível mecanismo de ação dos AGPI.

Os tratamentos atualmente disponíveis para acidemia metilmalônica não são completamente eficazes na prevenção das manifestações clínicas da doença. Desta forma, tornam-se necessárias novas alternativas terapêuticas, independentes da inibição da COX-2, e que produzam menos efeitos colaterais. Neste ínterim, os resultados evidenciados no presente estudo podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da acidemia metilmalônica e no estabelecimento de novas condutas terapêuticas.

Embora os pacientes metilmalonicacidêmicos apresentem alterações comportamentais e bioquímicas tais como convulsões (Fenton & Rosenberg, 1995), compatíveis com o modelo experimental utilizado, é difícil extrapolar resultados obtidos com animais para seres humanos, e estudos específicos com pacientes são necessários para avaliar as implicações clínicas dos resultados encontrados.

Em resumo, neste estudo foi demonstrado que o tratamento a longo prazo com óleo de peixe atenua as convulsões induzidas por MMA. Estes resultados indicam que o óleo de peixe, rico em AGPI n-3, possui atividade anticonvulsivante, e que o aumento da ingestão destes ácidos graxos pode ser especialmente benéfico para pacientes metilmalonicacidêmicos. De acordo, tem sido relatada a diminuição dos níveis de triglicerídios plasmáticos nestes pacientes através da suplementação com AGPI n-3, sem causar efeitos adversos (Aldamiz-Echevarria et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

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

1. O tratamento crônico com óleo de peixe aumenta a latência e reduz a amplitude média dos registros eletroencefalográficos e o tratamento crônico com ácido oléico não altera a latência, porém reduz a amplitude média dos registros eletroencefalográficos característicos das convulsões induzidas por MMA.
2. O tratamento crônico com óleo de peixe ou ácido oléico não altera a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em ratos *ex vivo*.
3. O tratamento crônico com óleo de peixe previne a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela incubação com PGE_2 em ratos *in vitro* e o tratamento crônico com ácido oléico não previne redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela incubação com PGE_2 em ratos *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akarsu, E.S.; Mamuk, S; Comert, A. Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. **Epilepsy Res**, v. 30, p. 63-68, 1998.
- Akassoglou, K. et al. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. **J Immunol**, v. 158, p. 438-445, 1997.
- Akiba, S.; Sato, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. **Biol Pharm Bull**, v. 27, p. 1174-1178, 2004.
- Aldamiz-Echevarria, L. et al. Effect of docosahexaenoic acid administration on plasma lipid profile and metabolic parameters of children with methylmalonic acidemia. **J Inherit Metab Dis**, v. 29, p. 58-63, 2006.
- Allan, S.M.; Rothwell, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 734-744, 2001.
- Amer, M. et al. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with cardiovascular disease: a cautionary tale. **Cardiol Rev**, v. 18, p. 204-212, 2010.
- Ando T, et al. Propionic acidemia in patients with ketotic hyperglycinemia. **The Journal of Pediatrics**, v. 78, p. 827-832, 1971.
- Andre, V. et al. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Hippocampus**, v. 11, p. 452-468, 2001.
- Arita, M. et al. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **J Exp Med**, v. 201, p. 713-722, 2005.
- Armstrong DL. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. **Trends Neurosci**, v. 12, p. 117-122, 1989.
- Balosso, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Ann Neur**, v. 57, p. 804-812, 2005.
- Bartsch, H.; Nair, J.; Owen, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.
- Beal, M.F. et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. **J Neurosci**, v. 13, p. 4181-4192, 1993.

Behrens, M.I.; Koh, J.; Canzoniero, L.M.; Sensi, S.L.; Csernansky, C.A.; Choi, D.W. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. **Neuroreport**, v. 6, p. 545-548, 1995.

Bergstroem, S.; Danielsson, H.; Samuelsson, B. The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins and Related Factors 32. **Biochim Biophys Acta**, v. 90, p. 207-210, 1964.

Blok, W.L.; Katan, M.B.; van der Meer, J.W. Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. **J Nutr**, v. 126, p. 1515-1533, 1996.

Blondeau, N. et al. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. **Neurosci**, v. 109, p. 231-241, 2002.

Bosetti, F.; Langenbach, R.; Weerasinghe, G.R. Prostaglandin E2 and microsomal prostaglandin E synthase-2 expression are decreased in the cyclooxygenase-2-deficient mouse brain despite compensatory induction of cyclooxygenase-1 and Ca²⁺-dependent phospholipase A2. **J Neurochem**, v. 91, p. 1389-1397, 2004.

Bourre, J.M.; Dumont, O.; Piciotti, M.; Clement, M.; Chaudiere, J.; Bonneil, M.; Nalbone, G.; Lafont, H.; Pascal, G.; Durand, G. Essentiality of omega 3 fatty acids for brain structure and function. **World Rev Nutr Diet**, v. 66, p. 103-117, 1991.

Bromfield, E.; Dworetzky, B.; Hurwitz, S.; Eluri, Z.; Lane, L.; Replansky, S.; Mostofsky, D. A randomized trial of polyunsaturated fatty acids for refractory epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 12, p. 187-190, 2008.

Brorson, J.R.; Marcuccilli, C.J.; Miller, R.J. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. **Stroke**, v. 26, p. 1259-1266, 1995.

Brouillet, E.; Henshaw, D.R.; Schulz, J.B.; Beal, M.F. Aminooxyacetic acid striatal lesions attenuated by 1,3-butanediol and coenzyme Q10. **Neurosci Lett**, v. 177, p. 58-62, 1994.

Burns, S. P. et al. Propionylcarnitine excretion is not affected by metronidazole administration to patients with disorders of propionate metabolism. **Eur J Pediatr**, v. 155, p. 31-35, 1996.

Calder, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 83, p. 1505S-1519S, 2006.

Campbell, I.L. et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 90, p. 10061-10065, 1993.

Cao, C.; Matsumura, K.; Yamagata, K.; Watanabe, Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. **Brain Res**; v. 697 n. 1-2 p. 187-196, 1996.

Cardinale, G.J.; Carty, T.J.; Abeles, R.H. Effect of methylmalonyl coenzyme A, a metabolite which accumulates in vitamin B 12 deficiency, on fatty acid synthesis. **J Biol Chem**, v. 245, p. 3771-3775, 1970.

Chebolu, S. et al. Pranlukast prevents cysteinyl leukotriene-induced emesis in the least shrew (*Cryptotis parva*). **Eur J Pharmacol**, v. 628, p. 195-201, 2009.

Cheema-Dhadli, S, Leznoff, C.C. Halperin, M.L. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. **Pediatr Res**, v. 9, p. 905-908, 1975.

Chu, J.; Pratico, D. The 5-lipoxygenase as a common pathway for pathological brain and vascular aging. **Cardiovasc Psychiatry Neurol**, v.174, p. 657, 2009.

Ciapaite, J. et al. Palmitate and oleate have distinct effects on the inflammatory phenotype of human endothelial cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, p. 147-154, 2007.

Coleman, R.A.; Smith, W.L.; Narumiya, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Ver**, v. 46, p. 205-229, 1994.

Coluccia, A.; Borracci, P.; Renna, G.; Giustino, A.; Latronico, T.; Riccio, P.; Carratu, M.R. Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, p. 599-605, 2009.

Cornejo, V.; Manriquez, V.; Colombo, M.; Mabe, P.; Jimenez, M.; De la Parra, A.; Valiente, A.; Raimann, E. Phenylketonuria diagnosed during the neonatal period and breast feeding. **Rev Med Chil**, v. 131, p. 1280-1287, 2003.

Coude, F.X.; Sweetman, L.; Nyhan, W.L. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. **J Clin Investig**, v. 64, p. 1544-1551, 1979.

Das, U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnol J**, v. 1, p. 420-439, 2006.

Davies, N.M. et al. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. **J Pharm Pharm Sci**, v. 7, p. 217-226, 2004.

De Caterina, R. et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb**, v. 14, p. 1829-1836, 1994.

De Caterina, R.; Libby, P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. **Lipids**, v. 31, p. S57-63, 1996.

de Mello, C.F.; Begnini, J.; Jimenez-Bernal, R.E.; Rubin, M.A.; de Bastiani, J.; da Costa, E.Jr.; Wajner, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces

rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Res.** v. 721, p. 120-125, 1996.

Denzlinger, C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 23, p. 167-223, 1996.

Dona, M. et al. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. **Blood**, v. 112, p. 848-855, 2008.

Dutra, J.C.; Dutra-Filho, C.S.; Cardozo, S.E.; Wannmacher, C.M.; Sarkis, J.J.; Wajner, M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **J Inherit Metab Dis**, v. 16, p. 147-153, 1993.

Dyall, S.C.; Michael-Titus, A.T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **Neuromolecular Med**, v. 10, p. 219-235, 2008.

Engel Jr.J.; Pedley, T.A. What is Epilepsy? In: Engel Jr.J.; Pedley, T.A. (Eds.), **Epilepsy A Comprehensive Textbook**, v. 1, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1-7, 2008.

Engstrom, K.; Wallin, R.; Saldeen, T. Effect of low-dose aspirin in combination with stable fish oil on whole blood production of eicosanoids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 64, p. 291-297, 2001.

Fabene, P.F. et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nat Med.**, v. 14, p. 1377-1383, 2008.

Fenton, W.A., Rosemberg, L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7^a ed, New York, McGraw-Hill, p. 1423-1449, 1995.

Fenton, W.G.; Rosenblatt, D.S.. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8^a ed, New York, McGraw-Hill, p. 2165–2193, 2001.

Ferrari, D.; Cysneiros, R.M.; Scorza, C.A.; Arida, R.M.; Cavalheiro, E.A.; de Almeida, A.C.; Scorza, F.A. Neuroprotective activity of omega-3 fatty acids against epilepsy-induced hippocampal damage: Quantification with immunohistochemical for calcium-binding proteins. **Epilepsy Behav**, v. 13, p. 36-42, 2008.

Fiebich, B.L. et al. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. **J Neurochem**, v. 68, p. 704-709, 1997.

Figuera, M.R. et al. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport**, v. 10, p. 2039-2043, 1999.

Figuera M.R. et al. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **Int J Biochem & Cell Biol**, v. 35, n. 4, p. 465-473, 2003.

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

Fontella, F.U. et al. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 541-544, 2000.

Forstermann, U.; Boissel, J.P.; Kleinert, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **Faseb J**, v. 12, p. 773-790, 1998.

Frankel, D.L.; Wells, H.; Fillios, L.C. Concentrations of asparagine in tissues of prepubertal rats after enzymic or dietary depletion of asparagine. **Biochem J**, v. 132, p. 645-648, 1973.

Fujisawa, H. et al. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. **Jpn J Pharmacol**, v. 15, p. 327-334, 1965.

Fulco, A.J.; Mead, J.F. Metabolism of essential fatty acids. VIII. Origin of 5, 8, 11-eicosatrienoic acid in the fat-deficient rat. **J Biol Chem**, v. 234, p. 1411-1416, 1959.

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

Glasgow, A.M. Chase HP. Effect of pent-4-enoic acid, propionic acid and other short-chain fatty acids on citrulline synthesis in rat liver mitochondria. **Biochem J**, v. 156, p. 301-307, 1976.

Goldman, D.W.; Pickett, W.C.; Goetzl, E.J. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 117, p. 282-288, 1983.

Goua, M. et al. Regulation of adhesion molecule expression in human endothelial and smooth muscle cells by omega-3 fatty acids and conjugated linoleic acids: involvement of the transcription factor NF-kappaB? **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 78, p. 33-43, 2008.

Goyens, P.L. et al. Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 44-53, 2006.

Grisar, T.; Guillaume, D.; Delgado-Escueta, A.V. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, p. 141-149, 1992.

-
- Haanen, C.; Vermes, I. Apoptosis and inflammation. **Med Inflamm**, v. 4, p. 5-15, 1995.
- Halperin, M.L.; Schiller, C.M.; Fritz, I.B. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. **J Clin Investig**, v. 50, p. 2276-2282, 1971.
- Hayasaka, K. et al. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. **Tohoku J Exp Med**, v. 137, p. 329-334, 1982.
- Hemler, M., Lands, W.E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **J Biol Chem**, v. 251, p. 5575-5579, 1976.
- Hillman, R.E.; Otto, E.F. Inhibition of glycine-serine interconversion in cultured human fibroblasts by products of isoleucine catabolism. **Pediatr Res**, v. 8, p. 941-945, 1974.
- Hinson, R.M.; Williams, J.A.; Shacter, E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 4885-4890, 1996.
- Hoffmann, G.F. et al. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. **J Inherit Metab Dis**, v. 16, p. 648-669, 1993.
- Hoffmann, C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. **Curr Med Chem**, v. 7, p. 1113-1120, 2000.
- Horisberger, J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiol**, v. 19, p. 377-387, 2004.
- Horrocks, L.A.; Farooqui, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 70, p. 361-372, 2004.
- Hulbert, A.J. et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biol Rev**, v.80, p. 155-169, 2004.
- Itokazu, N.; Ikegaya, Y.; Nishikawa, M.; Matsuki, N. Bidirectional actions of docosahexaenoic acid on hippocampal neurotransmissions in vivo. **Brain Res**, v. 862, p. 211-216, 2000.
- Jakschik, B.A.; Morrison, A.R.; Sprecher, H. Products derived from 5,8,11-eicosatrienoic acid by the 5-lipoxygenase-leukotriene pathway. **J Biol Chem**, v. 258, p. 12797-12800, 1983.

-
- James, M.J. et al. Effect of dietary supplementation with n-9 eicosatrienoic acid on leukotriene B₄ synthesis in rats: a novel approach to inhibition of eicosanoid synthesis. **J Exp Med**, v. 178, p. 2261-2265, 1993.
- James, M.J.; Gibson, R.A.; Cleland, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 343S-348S, 2000.
- Jamme, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, p. 333-337, 1995.
- Jonas, A.P. Lipoprotein structure. In: Vance, D. a. V., JE , **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, Elsevier, 2008.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- Kang, J.X.; Xiao, Y.F.; Leaf, A. Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 3997-4001, 1995.
- Kaufmann, W.E. et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 2317-2321, 1996.
- Khalfoun, B. et al. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. **Adv Exp Med Biol**, v. 400B, p. 589-597, 1997.
- Kim, J.; Alger, B.E. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. **Nat Neurosci**, v. 7, p. 697-698, 2004.
- Kis, B.; Snipes, J.A.; Busija, D.W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 315, p. 1-7, 2005.
- Kitajka, K. et al. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 2619-2624, 2002.
- Kleen, J.K.; Holmes, G.L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med**, v. 14, p. 1309-1310, 2008.
- Kowaltowski, A.J. et al. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. **Exp Neurol**, v. 201, p. 165-171, 2006.
- Lauritzen, I. et al. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. **Embo J**, v. 19, p. 1784-1793, 2000.

Laye, S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 82, p. 295-303, 2010.

Le, H.D. et al. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 81, p. 165-170, 2009.

Leaf, A. The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of n-3 polyunsaturated fatty acids: heart and brain. **Lipids**, v. 36, p. S107-110, 2001.

Leaf, A. et al. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. **Circulation**, v. 107, p. 2646-2652, 2003.

Lee, J.H.; O'Keefe, J.H.; Lavie, C.J.; Harris, W.S. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, p. 753-758, 2009.

Lees, G.J. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 120, p. 159-162, 1990.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. Worth Publishers, New York, 2000.

Leonard, J.V.; Walter, J.H.; McKiernan, P.J. The management of organic acidaemias: the role of transplantation. **J Inherit Metab Dis**, v. 24, p. 309-311, 2001.

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

Lichtenstein, A.H. et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, v. 114, p. 82-96, 2006.

Ludolph, A.C. et al. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Can J Neurol Sci**, v. 18, p. 492-498, 1991.

Machado, A. **Neuroanatomia Funcional**. Atheneu, Rio de Janeiro, 2006.

Machwate, M. et al. Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2). **Mol Pharmacol**, v. 60, p. 36-41, 2001.

MacNamara, J.O. **Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, 2006.

Madl, J.E.; Burgesser, K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. **J Neurosci**, v. 13, p. 4429-4444, 1993.

Malfatti, C.R. et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. **Epilepsia**, v. 44, p. 761-767, 2003.

Malfatti, C.R. et al. Convulsions induced by methylmalonic acid are associated with glutamic acid decarboxylase inhibition in rats: a role for GABA in the seizures presented by methylmalonic acidemic patients? **Neurosci**, v. 146, p. 1879-1887, 2007.

Marisco, P.C. et al. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Exp Neurol**, v. 182, p. 455-460, 2003.

Martlett, L.J. The COXIB experience: A look in the rearview mirror. **Annual Rev Pharm and Toxic**, v. 49, p. 265-290, 2009.

McDonald, J.W.; Schoepp, D.D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Res**, v. 624, p. 239-244, 1993.

Mitchell, J.A.; Warner, T.D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p. 75-86, 2006.

Mori, T.A.; Beilin, L.J. Omega-3 fatty acids and inflammation. **Curr Atheroscler Rep**, v. 6, p. 461-467, 2004.

Moseley, A.E. et al. Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, p. 616-626, 2007.

Mukherjee, P.K. et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 8491-8496, 2004.

Miyamoto, T. et al. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J Biol Chem**, v. 251, p. 2629-2636, 1976.

Naffah-Mazzacoratti, M.G.; Bellissimo, M.I.; Cavalheiro, E.A. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 27, p. 461-466, 1995.

Narumiya, S.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, v. 79, p. 1193-1226, 1999.

Nathanson, J.A.; Scavone, C.; Scanlon, C.; McKee, M. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron**, v. 14, p. 781-794, 1995.

Needleman, P. et al. Arachidonic acid metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986.

Negishi, M.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A. Prostaglandin E receptors. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v. 12, p. 379-391, 1995.

Nguyen, M.D.; Julien, J.P.; Rivest, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nature Rev**, v. 3, n. 3, p. 216-227, 2002.

NIH – www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi. Acessado em 01/06/2010.

Oberholzer, V.G.; Levin, B.; Burgess, E.A.; Young, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. **Arch Dis Child**, v. 42, p. 492-504, 1967.

Ogier de Baulny, H. Management and emergency treatments of neonates with a suspicion of inborn errors of metabolism. **Semin Neonatol**, v. 7, p. 17-26, 2002a.

Ogier de Baulny, H.; Saudubray, J. M. Branched-chain organic acidurias. **Semin Neonatol**, v. 7, p. 65-74, 2002b.

Oliveira, M.S. et al. Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neurosci**, v. 152, p. 1110-1118, 2008a.

Oliveira, M.S. et al. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 79, p. 14-21, 2008b.

Oliveira, M.S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v. 109, p. 416-426, 2009.

Patel, M.S.; Owen, O.E. Effect of hyperphenylalaninaemia on lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. **Biochem J**, v. 154, p. 319-325, 1976.

Pavlakovic, G.; Eyer, C.L.; Isom, G.E.; Neuroprotective effects of PKC inhibition against chemical hypoxia. **Brain Res**, v. 676, p. 205-211, 1995.

Phillis, J.W.; Horrocks, L.A.; Farooqui, A.A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Res Rev**, v. 52, p. 201-243, 2006.

Pitkanen, A; Sutula, T.P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 1, n. 3, p. 173-181, 2002.

Porta, N. et al. Anticonvulsant effects of linolenic acid are unrelated to brain phospholipid cell membrane compositions. **Epilepsia**, v. 50, p. 65-71, 2009.

Rabinovitz, S.; Mostofsky, D.I.; Yehuda, S. Anticonvulsant efficiency, behavioral performance and cortisol levels: a comparison of carbamazepine (CBZ) and a fatty acid compound (SR-3). **Psychoneuroendocr**, v. 29, p. 113-124, 2004.

Richardson, A.J.; Montgomery, P. The Oxford-Durham study: a randomized, controlled trial of dietary supplementation with fatty acids in children with developmental coordination disorder. **Pediatrics**, v. 115, p. 1360-1366, 2005.

Rosa, A.O.; Rapoport, S.I. Intracellular- and extracellular-derived Ca(2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, p. 697-705, 2009.

Rothman, S.M. Excitotoxins: possible mechanisms of action. **An N York Acad Sci**, v. 648, p. 132-139, 1992.

Rothwell, N.J.; Luheshi, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends Neurosci**, v. 23, p. 618-625, 2000.

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

Royes, L.F. et al. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. **Epilepsy Res**, v. 73, p. 228-237, 2007.

Salem Jr., N. **Introduction to polyunsaturated fatty acids**. Backgrounder, v.3, n.1, p.1-8, 1999.

Salvadori, M.G.S. et al. Prostaglandin E2 potentiates methylmalonate-induced seizures. Submetido à **Epilepsia**.

Sang, N. et al. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. **J Neurosci**, v. 25, p. 9858-9870, 2005.

Sayyah, M. et al. Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats. **Exp Neurol**, v. 191, n. 1, p. 145-153, 2005.

Schlanger, S.; Shinitzky, M.; Yam, D. Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. **Epilepsia**, v. 43, p. 103-104, 2002.

Siesjo, B.K. Measurements of cerebral oxygen consumption: advantages and limitations. **Eur Neurol**, v. 20, p. 194-199, 1981.

Simmons, D.L.; Botting, R.M.; Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v. 56, p. 387-437, 2004.

Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 365-379, 2002.

-
- Skou, J.C.; Esmann, M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr**, v. 24, p. 249-261, 1992.
- Slanina, K.A.; Schweitzer, P. Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. **Neuropharm**, v. 49, p. 653-659, 2005a.
- Slanina, K.A.; Roberto, M.; Schweitzer, P. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. **Neuropharm**, v. 49, p. 660-668, 2005b.
- Smith, W.L.; DeWitt, D.L.; Garavito, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 145-182, 2000.
- Smyth, E.M.; Burke, A.; FitzGerald, G.A. Autacoides Derivados de Lipídeos: eicosanoides e fator de ativação das plaquetas. In: Brunton, L. L. et al. , Goodman e Gilamn. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc-Graw Hill, Rio de Janeiro 2006.
- Snyder, S.H.; Bredt, D.S. Biological roles of nitric oxide. **Scient Am**, v. 266, p. 68-71, 74-67, 1992.
- Snyder ,S.H.; Sabatini, D.M. Immunophilins and the nervous system. **Nat Med**, v. 1, p. 32-37, 1995.
- Souza, M.A. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, p. 811-823, 2009.
- Swanson, R.A.; Farrell, K.; Simon, R.P. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 15, p. 417-424, 1995.
- Stellwagen, D. et al. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. **J Neurosci**, v. 25, p. 3219-3228, 2005.
- Stewart, P.M.; Walser, M. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid-loaded rats. Proposed mechanism for the hyperammonemia of propionic and methylmalonic acidemia. **J Clin Investig**, v. 66, p. 484-492, 1980.
- Stoll, G; Jander, S; Schroeter, M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. **J Neural Transm**, v. 59, p. 81-89, 2000.
- Sugimoto, Y.; Narumiya, S. Prostaglandin E receptors. **J Biol Chem**, v. 282, p. 11613-11617, 2007.
- Taha, A.Y.et al. Lack of benefit of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on seizure latency, duration, severity or incidence in rats. **Epilepsy Res**, v. 71, p. 40-46, 2006.

Taha, A.Y.; Ciobanu, F.A.; Saxena, A.; McIntyre Burnham, W. Assessing the link between omega-3 fatty acids, cardiac arrest, and sudden unexpected death in epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 14, p. 27-31, 2009a.

Taha, A.Y. Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 50, p. 72-82, 2009b.

Tomimoto, H. et al. Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans. **Acta Neuropathol**, v. 99, p. 26-30, 2000.

Treacy, E. et al. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. **J Pediatr**, v. 129, p. 445-448, 1996.

Trichopoulos, A.; Critselis, E. Mediterranean diet and longevity. **Eur J Cancer Prev**, v. 13, p. 453-456, 2004.

Umemura, A.; Mabe, H.; Nagai, H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. **Stroke**, v. 23, p. 1163-1166, 1992.

Ushikubi, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 395, p. 281-284, 1998.

Utter, M.E.; Fung, C.H. Possible control mechanisms of liver pyruvate carboxylase. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiologische Chemie**, v. 351, p. 284-285, 1970.

van der Meer, S.B.; Poggi, F.; Spada, M.; Bonnefont, J.P.; Ogier, H.; Hubert, P.; Depondt, E.; Rapoport, D.; Rabier, D.; Charpentier, C.; et al. Clinical outcome of long-term management of patients with vitamin B12-unresponsive methylmalonic acidemia. **J Pediatr**, v. 125, p. 903-908, 1994.

Vance, D.E.; Vance, J.E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

Vane, J.R.; Bakhle, Y.S.; Botting, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998.

Vermuri, M.; Kelley, D. S. The effects of dietary fatty acids on lipid metabolism. In: **Fatty Acids and Foods and Their Health Implications**. 3^a ed., CRC press, p. 591-630, 2008.

Vezzani, A. Inflammation and epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 5, p. 1-6, 2005.

Vezzani, A; Balosso, S; Ravizza, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain, Behav, and Immun**, v. 22, p. 797-803, 2008.

Vidensky, S. et al. Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response. **Neuromolecular Med**, v. 3, p. 15-28, 2003.

von Schacky, C.; Harris, W.S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. **Cardiovasc Res**, v. 73, p. 310-315, 2007.

Vreugdenhil, M. et al. Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 12559-12563, 1996.

Wang, S.; Cheng, Q.; Malik, S.; Yang, J. Interleukin-1 β inhibits gamma-aminobutyric acid type A GABA receptor current in cultured hippocampal neurons. **J Pharm Exp Therap**, v. 292, p. 497-504, 2000.

Wajner, M.; Dutra, J.C.; Cardoso, S.E.; Wannmacher, C.M.; Motta, E.R. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **J Inherit Metab Dis**, v. 15, p. 92-96, 1992.

Wajner, M.; Barschak, A.G.; Luft, A.P.; Pires, R.; Grillo, E.; Lohr, A.; Funayama, C.; Sanseverino, M.T.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. Organic aciduria: diagnosis in high-risk Brazilian patients. **J Pediatr**, v. 77, p. 401-406, 2001.

Williams, C.S.; DuBois, R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? **Am J Physiol**, v. 270, p. G393-400, 1996.

Williams, J.A.; Shacter, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E₂. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **J Biol Chem**, v. 272, p. 25693-25699, 1997.

Willis, S. et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are not anticonvulsant or neuroprotective in acute mouse seizure models. **Epilepsia**, v. 50, p. 138-142, 2009.

Xiao, Y.F. et al. Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 11000-11004, 1995.

Xiao, Y.F. et al. Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 4182-4187, 1997.

Xiao, Y.F.; Li, X. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. **Brain Res**, v. 846, p. 112-121, 1999.

Yamagata, K. et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, v. 1, p. 371-386, 1993.

Yedgar, S.; Lichtenberg, D.; Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 182-187, 2000.

Yehuda, S.; Carasso, R.L.; Mostofsky, D.I. Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 254, p. 193-198, 1994.

Young, C. et al. Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. **Synapse**, v. 37, p. 90-94, 2000.

Yuen, A.W.; Sander, J.W.; Fluegel, D.; Patsalos, P.N.; Bell, G.S.; Johnson, T.; Koepp, M.J. Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: a randomized trial. **Epilepsy Behav**, v. 7, p. 253-258, 2005.