



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

**PROSTAGLANDINA E₂ POTENCIALIZA AS
CONVULSÕES INDUZIDAS POR METILMALONATO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**PROSTAGLANDINA E₂ POTENCIALIZA AS CONVULSÕES
INDUZIDAS POR METILMALONATO**

Por

Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

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

Santa Maria, RS, Brasil

2009

“De tudo só ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar
Portanto devemos
Fazer da interrupção um novo caminho
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro.”
Fernando Pessoa

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

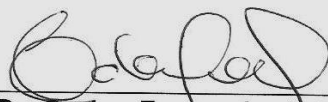
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PROSTAGLANDINA E₂ POTENCIALIZA AS CONVULSÕES
INDUZIDAS POR METILMALONATO**

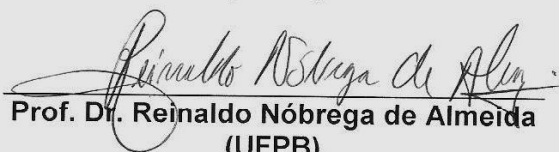
elaborada por
Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

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

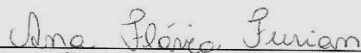
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
(UFPB)



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

Santa Maria, 23 de novembro de 2009.

Dedicatória

Aos meus pais (*in memoriam*).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre junto de mim, iluminando meu caminho, fazendo com que eu tomasse as decisões certas e não desistisse diante dos desafios.

Agradeço ao meu orientador, professor Carlos Mello, por acolher-me no seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos. Obrigada por tudo, de coração!

A minha filha Ana Luiza por encher minha vida de alegria, pela constante companhia, amor, carinho e compreensão. Amo muito você minha Fofuchinha!

Ao meu esposo Fabiano, agradeço pelo exemplo, incentivo, dedicação e compreensão em todos os momentos. Sem o teu apoio eu não teria chegado até aqui! Obrigado!

Aos meus irmãos, por torcerem sempre pelo meu sucesso. Amo muito vocês!

A toda família Salvadori, que foram presença constante, por compartilhar os momentos de dificuldades bem como das minhas conquistas.

As queridas colegas e grandes amigas Cristina, Anajara, Aninha e Juliana, agradeço pela infinita disponibilidade, pela dedicação e responsabilidade. Descobri em vocês grandes amigas!

Aos meus colegas e amigos do laboratório 21, Mauro, Léo, André, Ana Flávia, Felipe, Dani, Mauren, Vanessa, Lívia, Letícia, Samurai, Fred, Luiz, Lele, Maurício, André, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores Juliano Ferreira, Luis Fernando Freire Royes e Michele Rechia Figuera 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 tornar possível o sonho da pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante a realização desse trabalho.

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

RESUMO

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

PROSTAGLANDINA E₂ POTENCIALIZA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR METILMALONATO

Autora: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Orientador: Carlos Fernando de Mello
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 23 de novembro de 2009.

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo (EIM) caracterizado bioquimicamente e clinicamente pelo acúmulo tecidual de ácido metilmalônico (MMA) e disfunção neurológica, que inclui convulsões. A experiência clínica sugere que infecções precipitam crises metabólicas em pacientes metilmalonicacidêmicos. À medida em que foi demonstrado que o MMA causa convulsões, e que a inflamação pode contribuir para a ocorrência de convulsões em vários modelos animais, é possível que mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, facilitem as convulsões induzidas por MMA. A ciclooxigenase (COX) é a enzima marca-passo na rota metabólica pela qual o ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas, e a COX-2 uma isoforma da ciclooxigenase, é induzida em sítios de lesão/inflamação, e também se expressa constitutivamente em alguns tecidos, como o sistema nervoso central (SNC). Tem sido sugerido que a prostaglandina E₂ (PGE₂), principal produto da via COX-2 no SNC, tenha um papel importante em várias doenças neurodegenerativas, incluindo epilepsia. Contudo, até a presente data nenhum estudo avaliou se mediadores inflamatórios, como a PGE₂, facilitam as convulsões induzidas por MMA. Assim, neste estudo investigamos o papel da COX-2 e da PGE₂ nas convulsões induzidas por MMA (2,5 μmol/2,5 μL, i.c.v.). Verificamos que a PGE₂ (100 ng/2 μL, i.c.v.) facilita as convulsões induzidas por este ácido orgânico. Além disso, verificamos que o celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, na dose de 2 mg/kg (v.o.), atenuou as convulsões comportamentais e eletrográficas induzidas por MMA no hipocampo e córtex cerebral de ratos. O efeito protetor do celecoxibe contra as convulsões induzidas por MMA foi revertido pela administração i.c.v. de prostaglandina E₂. O conjunto de dados deste estudo suporta um papel facilitatório para a via COX-2/PGE₂ nas convulsões induzidas por MMA.

Palavras-chaves: metilmalonato, convulsões, inflamação, prostaglandina E₂, celecoxibe

ABSTRACT

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

PROSTAGLANDIN E₂ POTENTIATES METHYLMALONATE-INDUCED SEIZURES

Author: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Advisor: Carlos Fernando de Mello
Date and place of the defense: Santa Maria, November 23rd, 2009.

Methylmalonic acidemias comprehend a group of innate error of the metabolism (EIM) characterized clinically and biochemically for the tissue accumulation of acid methylmalonic (MMA) and neurological dysfunction, including seizures. The clinical experience suggests that infections precipitate metabolic crises in methylmalonic acidemic patients. Since it has been demonstrated that MMA cause seizures, and that inflammation facilitates the occurrence of seizures in some animal models, is possible that inflammatory mediators, such as the prostaglandins, also facilitate MMA-induced seizures. Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme in the metabolic route by which the arachidonic acid is converted to prostaglandins. COX-2 is an isoform of cyclooxygenase that is induced at sites of injury / inflammation, and that is also constitutively expressed in some tissues, such as the central nervous system (CNS). It has been suggested that prostaglandin E₂ (PGE₂), the main product of COX-2 in the CNS, plays an important role in some neurodegenerative diseases, including epilepsy. However, no study has evaluated whether inflammatory mediators, such as the PGE₂, facilitates MMA-induced seizures, to date. Thus, in this study we investigated the role of COX-2 and of PGE₂ in seizures induced by MMA (2,5 μmol/2,5 μL, i.c.v.). While PGE₂ (100 ng/2 μL, i.c.v.) facilitated, the selective COX-2 inhibitor celecoxib, attenuated MMA-induced seizures, assessed by electroencephalographic recordings in the hippocampus and cerebral cortex of rats. The protective effect of celecoxib against MMA-induced seizures was prevented by the PGE₂. The results of this study support a facilitatory role for COX-2/PGE₂ pathway in the MMA-induced seizures.

Keywords: methylmalonate, seizures, inflammation, prostaglandin E₂, celecoxib.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Isoformas de ciclooxigenases.....	22
Figura 1. Metabolismo do L-metilmalonil-CoA.....	07
Figura 2. Falência energética e excitotoxicidade induzida pelo glutamato no modelo de acidemia metilmalônica	13
Figura 3. Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico
AINEs – antiinflamatórios não-esteroidais
AMPA – α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANOVA – análise de variância
APOH – área pré-óptica do hipotálamo anterior
ATP – trifosfato de adenosina
CO₂ – dióxido de carbono
COX – ciclooxigenase
COX-1 – ciclooxigenase 1
COX-2 – ciclooxigenase 2
COX-3 – ciclooxigenase 3
EIM – erro inato do metabolismo
EP1 – receptor para prostaglandina E₂, tipo 1
EP2 – receptor para prostaglandina, tipo 2
EP3 – receptor para prostaglandina, tipo 3
EP4 – receptor para prostaglandina, tipo 4
GABA – ácido γ -aminobutírico
i.c.v. – intracerebroventricular
IL-1 β – interleucina 1 β
K⁺ – potássio
kg – kilograma
LDH – lactato desidrogenase
L-NAME – Metil éster de N^w-nitro-L-arginina
LPS – lipopolissacarídeo bacteriano
LOX – lipooxigenase
LTP – potencialização de longa duração
mg – miligrama
Mg²⁺ – magnésio
MK-801 – dizocilpina
MMA – ácido metilmalônico ou metilmalonato
MN – membrana nuclear
MP – membrana plasmática
mPGES-1 – prostaglandina E sintase microsomal 1
MRE – membrana de retículo endoplasmático
NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Na⁺ – sódio
ng – nanograma
NH₃ – amônia

NMDA – *N*-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NOS_i – óxido nítrico sintase induzível
NOS_e – óxido nítrico sintase endotelial
NOS_n – óxido nítrico sintase neuronal
NO_x – nitrito e nitrato
3-NPA – ácido 3-nitropropiónico
3-NT – 3 nitrotirosina
O₂^{•-} – radical superóxido
OH[•] – radical hidroxil
ONOO⁻ – peroxinitrito
PBS – Solução salina (NaCl 0,9 %) tamponada com fosfato
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}
PGG₂ – prostaglandina G₂
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaciclina
PGs – prostaglandinas
PKC – proteína quinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLC – fosfolipase C
PTZ – pentilenotetrazol
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDH – succinato desidrogenase
SNC – sistema nervoso central
TNF-α – fator de necrose tumoral α
TXA₂ – tromboxano A₂
TXB₂ – tromboxano B₂
μL – microlitro
v.o. – via oral

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
APRESENTAÇÃO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo Geral	05
2.2 Objetivos Específicos	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1. Academia Metilmalônica	07
3.1.1 <i>Fisiopatologia</i>	08
3.1.2 <i>Manifestações Clínicas /nerológicas</i>	09
3.1.3 <i>Efeito convulsivante do MMA: Papel do receptor NMDA</i>	10
3.1.4 <i>Inflamação e o Sistema Nervoso Central</i>	14
3.1.5 <i>Óxido Nítrico</i>	16
3.2 Ciclooxigenases e Prostaglandinas	18
3.2.1 <i>COX-2 e Prostaglandinas no Cérebro</i>	24
3.2.2 <i>Papel Fisiológico da COX-2 e da Prostaglandina E2 no cérebro</i> ...	25
3.2.2.1 <i>Termorregulação e Febre</i>	25
3.2.2.2 <i>Aprendizado e Memória</i>	26
3.2.3 <i>Papel das Cyclooxygenases, PGD₂ e da PGE₂ nas convulsões induzidas por diferentes agentes</i>	27
3.2.3.1 <i>Cainato</i>	28
3.2.3.2 <i>Pilocarpina</i>	28
3.2.3.3 <i>Pentilenotetrazol</i>	29

4. CAPÍTULO I	31
4.1. Capítulo I: Manuscrito submetido	32
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

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 contido neste trabalho.

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

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo causado por inibição ou pouca atividade da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (EC.5.5.99.2), enzima esta dependente da vitamina B₁₂, responsável pela conversão de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA na rota da degradação do propionato. A deficiência da metilmalonil-CoA mutase resulta em acúmulo de L-metilmalonil-CoA, ácido metilmalônico (MMA) e de outros metabólitos secundários (Figura 1 - Fenton et al., 1995), como o ácido propiônico. A acidemia metilmalônica é classificada como uma acidemia orgânica, com incidência de 1:48.000 nascidos vivos (Fenton et. al., 1995).

As manifestações clínicas da acidemia metilmalônica ocorrem normalmente na primeira semana de vida e são predominantemente neurológicas, com encefalopatia aguda grave ou crônica, letargia, hipotonia, retardo mental e psicomotor, alterações comportamentais e neuropsiquiátricas, atrofia cerebral, anormalidades no eletroencefalograma, apatia, 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 que se instala o distúrbio metabólico (Ogier e Saudubray, 1990). Os pacientes que sobrevivem (menos de 15% no período de dois anos) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de, alterações comportamentais, e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Dutra et al., 1993). Achados clínicos, embora não publicados, relacionam que infecções precipitam as crises metabólicas nos pacientes metilmalonicidêmicos ocorrendo o agravamento do quadro clínico neurológico, incluindo aumento das convulsões (Comunicação pessoal: Prof. Dr. Moacir Wajner, da UFRGS).

Estudos em animais têm buscado evidenciar se a inflamação é um componente da etiologia da epilepsia, ou uma conseqüência das convulsões (Pitkanen e Sutura, 2002). Neste sentido, estudos em cérebro de roedores demonstraram que mediadores inflamatórios são produzidos durante atividade epilética pela microglia, astrócitos e neurônios. Há evidências de que tanto a

imunidade adaptativa quanto a inata contribuem para a indução e perpetuação da inflamação no cérebro de pacientes epilépticos (Nguyen et al., 2002).

De fato, estudos com diferentes agentes convulsivantes, como pentilenotetrazol, cainato e pilocarpina têm demonstrado o envolvimento da prostaglandina E_2 , principal produto da via da ciclooxigenase-2 no SNC, no agravamento de convulsões (Kelley et al., 1999; Takemiya et al., 2003). Além disso, inibidores da ciclooxigenase-2 atenuam as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (Kunz, 2001; Akarsu, 2006; Akula, 2008; Oliveira, 2008).

Estes dados sugerem uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e a ocorrência de convulsões, o que é corroborado pelos estudos clínicos que mostraram que a diminuição do processo inflamatório cerebral está associado a uma diminuição nas convulsões em pacientes com malária (Singh e Prabhakar, 2008). Uma vez que há indícios de que a infecção e/ou inflamação facilitam as crises metabólicas e a disfunção neurológica em pacientes metilmalonicacidêmicos, e que as convulsões que estes pacientes apresentam são de difícil controle, é de especial interesse determinar se a prostaglandina E_2 , um importante mediador da resposta inflamatória, pode contribuir para o desenvolvimento de convulsões no modelo da acidemia metilmalônica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar o papel da prostaglandina E_2 nas convulsões induzidas por metilmalonato.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da PGE_2 (100 ng/ 2 μ L, i.c.v.) sobre a latência e duração dos episódios convulsivos induzidos pela injeção de MMA (2,5 μ mol/ 2 μ L, i.c.v.) em ratos.

2. Investigar se um inibidor da ciclooxigenase-2, celecoxibe, atenua as convulsões induzidas pela administração de MMA (2,5 μ mol/ 2 μ L, i.c.v.).

3. Verificar se o efeito protetor do inibidor da ciclooxigenase-2 (celecoxibe) contra as convulsões induzidas por MMA é revertido pela administração intracerebroventricular de PGE_2 .

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Acidemia metilmalônica

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo, causado por inibição ou pouca atividade da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (EC.5.5.99.2), uma enzima dependente de vitamina B₁₂, responsável pela conversão de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA na rota da degradação do propionato. A L-metilmalonil-CoA mutase é uma proteína com 150 KDa encontrada na matriz mitocondrial sob forma dimérica, e possui duas subunidades idênticas, cada uma delas contendo um sítio ativo para adenosil cobalamina e um sítio ativo para metilmalonil-CoA. Na reação de isomerização de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA, a enzima transfere o grupo carboxil-CoA (Fenton et al., 1995). A deficiência desta atividade enzimática leva ao acúmulo de ácido metilmalônico (MMA) e de outros metabólitos secundários, como propionato, metilcitrato, β-OH-propionato e cetonas de cadeia longas.

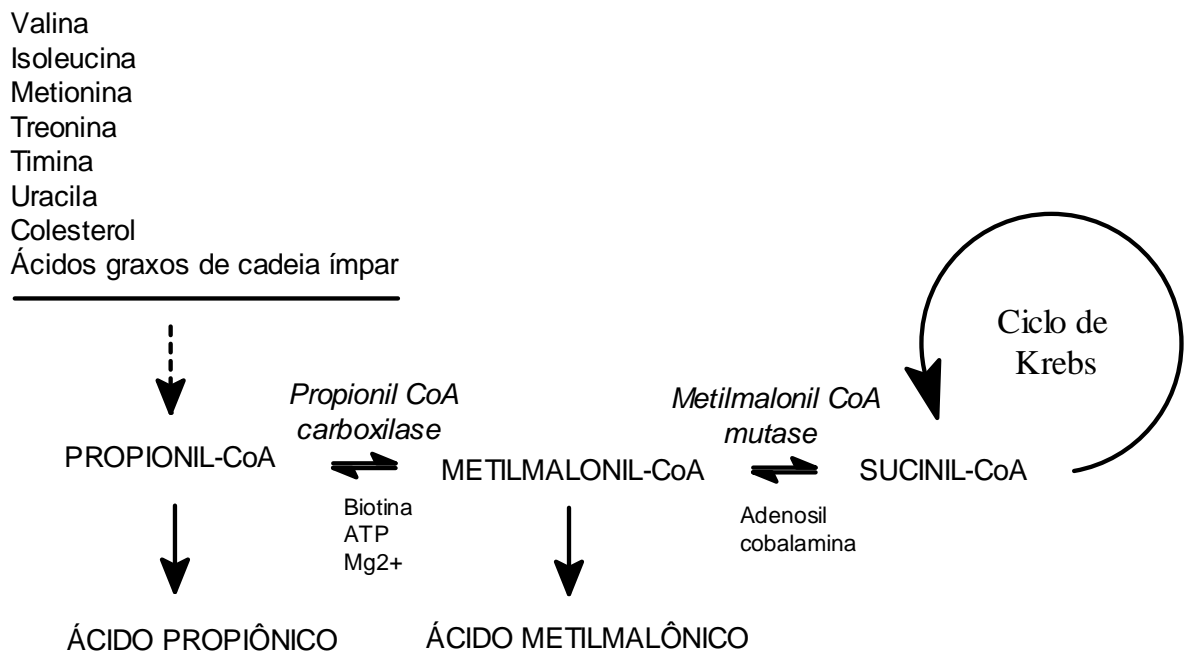


Figura 1 - Metabolismo do L-metilmalonil-CoA. A enzima metilmalonil-CoA mutase é responsável pela conversão do L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA na rota de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar e do propionato.

A acidemia metilmalônica foi descrita pela primeira vez por Oberholzer et al. em 1967, que observaram quantidades elevadas de ácido metilmalônico (MMA) no sangue e na urina em crianças que apresentavam cetoacidose. Além disso, o acúmulo de MMA pode gerar, além de acidose metabólica, hipercetonemia, hiperglicemia, hipoglicemia, hiperamonemia, neutropenia, trombocitopenia e deficiência na síntese de ácidos graxos (Fenton et al., 1995).

3.1.1 Fisiopatologia

A deficiência na atividade da metilmalonil-CoA mutase leva ao acúmulo de L-metilmalonil-CoA que, por tiólise espontânea transforma-se em ácido metilmalônico, o principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica (Fenton et al., 1995).

Utter e colaboradores (1970) demonstraram que a enzima piruvato carboxilase é inibida por metilmalonil-CoA, sugerindo que a gliconeogênese hepática pode estar comprometida pelos níveis elevados de MMA, assim como sua contribuição para a manutenção da glicemia. Além disso, foi demonstrado que o MMA inibe o transporte mitocondrial de malato, sugerindo mais um ponto de inibição possível para a gliconeogênese (Halperin et al.; 1971).

O MMA afeta o metabolismo dos corpos cetônicos, e a hipercetonemia observada na doença parece estar relacionada à menor utilização da acetil-CoA devido à inibição das atividades das enzimas citrato sintetase, aconitase e isocitrato desidrogenase pelo metilcitrato, um metabólito que se acumula na doença (Ando, 1971; Cheema-Dhadli, 1975).

A síntese de ácidos graxos no sistema nervoso e fígado de lactentes é feita a partir de corpos cetônicos. O passo inicial desta síntese é conversão de β -OH-butirato em acetoacetato pela β -OH-butirato desidrogenase. O MMA inibe competitivamente esta enzima em vários tecidos (Patel e Owen, 1976; Dutra et al., 1993), causando uma diminuição na síntese de ácidos graxos por redução na disponibilidade de fonte de carbonos para este fim. Também foi demonstrado por Cardinale (1970) que a metilmalonil-CoA inibe a incorporação de acetil-CoA e malonil-CoA em ácidos graxos em fígado de ratos, além deste próprio metabólito ser incorporado nas porções terminais das moléculas resultando ácidos graxos saturados e ramificados, cuja alterações estruturais poderiam afetar o funcionamento das células, como as propriedades da membrana celular. Frankel et

al., em 1973, observaram que a metilmalonil-CoA era capaz de inibir as atividades da acetil-CoA carboxilase e da sintetase de ácidos graxos em fígado e sistema nervoso de ratos deficientes em vitamina B₁₂, relacionando assim a diminuição na síntese de ácidos graxos ao acúmulo dos diferentes metabólitos comuns na acidemia metilmalônica.

Segundo Hillman e Otto (1974), uma das possíveis causas para a hiperglicinemia observada parece ser a inibição da enzima de clivagem da glicina em CO₂ e NH₃ por tiglatato e isoleucina, metabólitos que se encontram em concentrações elevadas na acidemia metilmalônica.

Outra característica importante da acidemia metilmalônica é a hiperamonemia, que afeta aproximadamente 70% dos pacientes (Fenton et al., 1995) e está associada a uma diminuição no funcionamento do ciclo da uréia. Segundo Coude et al. (1979) e Glasgow e Chase (1976), o propionil-CoA, um dos principais metabólitos acumulados na acidemia metilmalônica, inibe competitivamente a síntese de N-acetilglutamato a partir de acetil-CoA. O N-acetilglutamato é um ativador alostérico da carbamil fosfato sintetase, a enzima responsável pelo primeiro passo do ciclo da uréia. Um bloqueio na síntese da uréia resulta num acúmulo de amônia justificando a hiperamonemia apresentada por estes pacientes. Além disso, segundo Fenton e Rosenberg (1995), a própria inibição da carbamil fosfato sintetase por ésteres de CoA pode causar hiperamonemia. No entanto, em 1980, Stewart e Walser postularam que a causa da hiperamonemia em ratos tratados com MMA era mais complexa, uma vez que o aumento verificado nos níveis de aspartato e citrulina sugerem que o MMA possa exercer efeito inibitório sobre a argininosuccinato sintetase.

3.1.2 Manifestações Clínicas /neuroológicas

As manifestações clínicas da acidemia metilmalônica ocorrem normalmente na primeira semana de vida, e são predominantemente neuroológicas. Os pacientes afetados apresentam encefalopatia aguda ou crônica grave, letargia, hipotonia, retardo mental e psicomotor, alterações comportamentais e neuropsiquiátricas (déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista), atrofia cerebral, apatia, coma, anormalidades no eletroencefalograma e convulsões

(Hoffmann et al., 1993; Cornejo et al., 2003). Os pacientes que sobrevivem (menos de 15% no período de dois anos) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de alterações comportamentais, e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Dutra, 1992). O tônus muscular apresenta-se geralmente comprometido, e a hipotonia se acentua após crises de descompensação metabólica. Quando a instalação do distúrbio ocorre tardiamente (2 a 24 meses de vida) os pacientes apresentam um prognóstico melhor, tanto do ponto de vista da morbidade como da mortalidade. As alterações metabólicas são menos intensas que as observadas no início precoce e variam, desde ausência de comprometimento neurológico até cetoacidose leve e ataxia (van der Meer et al., 1994).

A deficiência de metilmalonil-CoA está associada a cetoacidose neonatal e infantil, falha de crescimento, insuficiência renal crônica, cardiomiopatia, infecções e disfunção neurológica, incluindo convulsões (Fenton e Rosenberg, 1995; Touati et al., 2006; Morath et al., 2008). Achados clínicos, embora não publicados, relacionam que infecções precipitam as crises metabólicas nos pacientes metilmalonicidêmicos e com isso ocorre o aumento das convulsões (Fonte: Comunicação pessoal Prof. Dr. Moacir Wajner).

3.1.3 Efeito convulsivante do MMA: Papel do receptor NMDA

Tem-se demonstrado que o acúmulo de MMA inibe competitivamente a succinato desidrogenase (SDH) e a β -OH-butilato desidrogenase cerebral *in vitro* (Dutra et al., 1993). Wajner et al., em 1992, observaram que este ácido reduz a produção de CO₂ e aumenta a produção de lactato pelo cérebro. O aumento de lactato pode contribuir para o dano cerebral, uma vez que, o acúmulo de ácido láctico tecidual pode provocar acidose grave, levando o pH para valores próximos a 6,0 (Siesjo, 1981). A diminuição do pH intracelular é capaz de inibir a recaptação de glutamato pela glia, mesmo havendo níveis normais de ATP e, com isso, 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). A partir destes dados, tem sido postulado que o MMA possa causar interferência no metabolismo aeróbico celular, levando provavelmente a uma diminuição na produção de ATP.

A inibição da SDH e conseqüente redução de ATP, levam a despolarização neuronal parcial por falência de várias ATPases que mantêm o gradiente de íons através das membranas celulares, principalmente da Na⁺, K⁺-ATPase (Nathanson et al., 1995). A despolarização da membrana leva à saída do Mg⁺² que bloqueia o canal do receptor glutamatérgico subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), de maneira voltagem dependente, e permite a entrada de íons, particularmente Ca⁺⁺ e, em menor grau, Na⁺, para o meio intracelular (McDonald e Schoepp, 1993).

O influxo de Na⁺ parece ser a responsável pelo edema celular que se verifica nos estágios iniciais do chamado dano excitotóxico, e ocorre principalmente através de canais associados a outro subtipo de receptor glutamatérgico, denominado AMPA-Cainato (porque liga o ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propionico) (Chan et al., 1979). O aumento na concentração celular de Ca⁺⁺ 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, que produz NO• (Snyder, 1992).

Além destes mecanismos de lesão celular envolvendo a despolarização da membrana pós-sináptica, a depleção de ATP leva ao aumento na liberação de glutamato através de mecanismos dependentes de cálcio e pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-sinapse (Madl, 1993). O aumento na concentração extracelular de glutamato ativa os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e AMPA/cainato e como consequência ocorrem os fenômenos celulares descritos acima. As células gliais também são afetadas pela inibição do metabolismo aeróbico, e podem contribuir para o aumento do glutamato extracelular através da diminuição e/ou reversão da recaptção do glutamato (Gemba, 1994). Como consequência do comprometimento do metabolismo energético ocorre nos astrócitos e neurônios, um processo de acidose intracelular devido ao acúmulo de lactato neste meio, sendo que este é capaz de inibir a recaptção de glutamato de astrócitos em cultura. Além disso, a diminuição do pH intracelular é capaz de inibir a recaptção do glutamato mesmo na presença de níveis teciduais normais de ATP, e contribuir para o dano excitotóxico (Swanson et al., 1995). Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular através de mecanismos que envolvem o glutamato, particularmente o receptor

subtipo NMDA. Entre eles podemos citar a rotenona, cianeto, oxi-aminoacetato, 3-nitropropionato e malonato; estes últimos inibidores da succinato desidrogenase, como o MMA (McDonald and Schoepp, 1993; Brouillet et al., 1994; Behrens et al., 1995, Pavlakovic, et al., 1995).

Além disso, o padrão das lesões no SNC causadas pela administração sistêmica do 3-NPA em ratos e pela intoxicação acidental em humanos é, morfológicamente, semelhante às observadas em pacientes portadores da acidemia metilmalônica, no que diz respeito ao comprometimento seletivo dos núcleos da base como o caudado e putâmen (Ludolph, et al., 1991; Beal, et al., 1993; Fenton e Rosenberg, 1995).

A administração de MMA intra-estriatal causa convulsões em ratos adultos, e estas convulsões são inibidas por MK-801 e atenuadas por succinato, sugerindo o envolvimento de receptores NMDA, e provavelmente da inibição da SDH nas convulsões induzidas por este ácido orgânico (de Mello et al., 1996). As convulsões induzidas por MMA são igualmente atenuadas pela administração de antioxidantes, como a vitamina C e a vitamina E (Figuera et al., 1999) e foi demonstrado que o MMA induz formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro* e reduz a capacidade antioxidante total do sistema nervoso, confirmando que a presença de MMA induz a formação de espécies reativas (Fontella, et al., 2000).

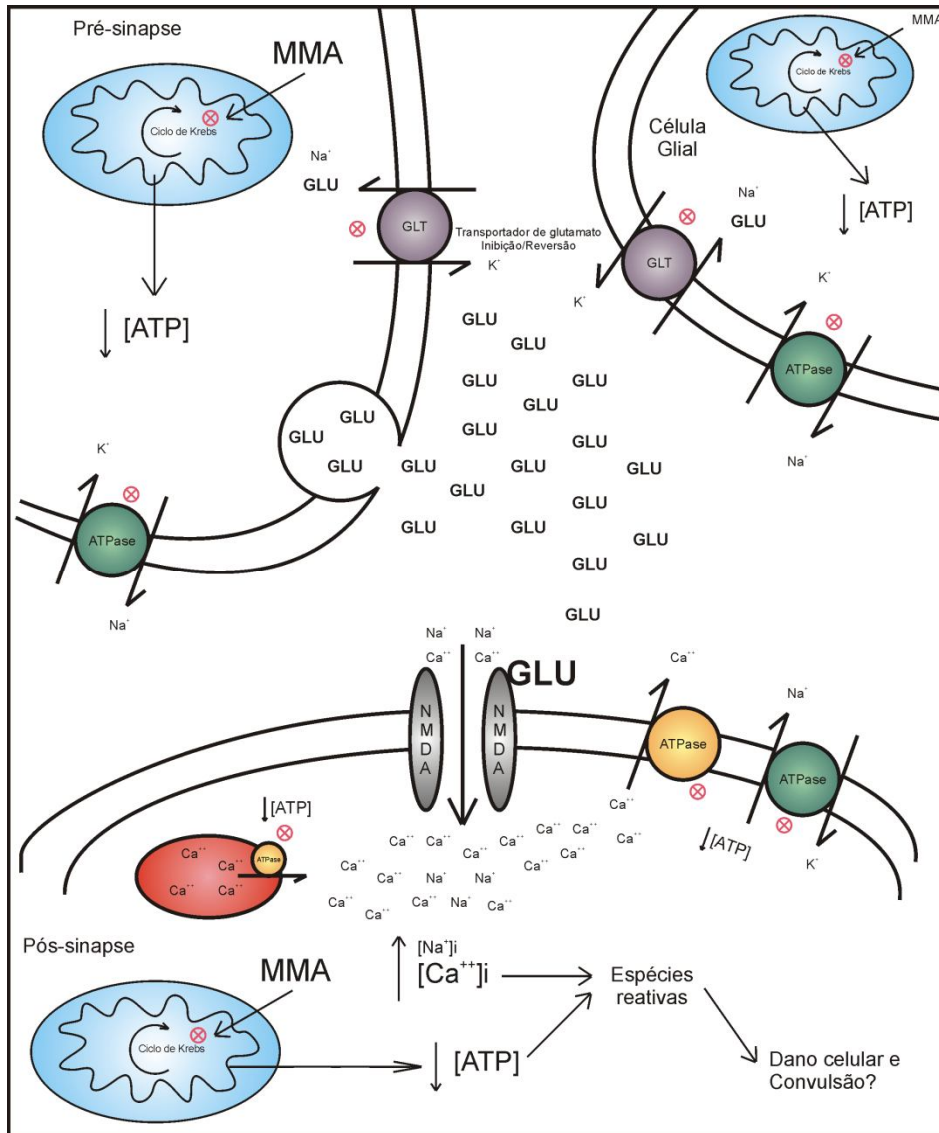


Figura 2. Modelo de falência energética e excitotoxicidade induzida pelo glutamato no modelo de acidemia metilmalônica. A inibição da SDH neuronal e glial induzida pelo MMA causa falência energética e inibição das ATPases, causando a despolarização e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca a liberação de glutamato armazenado nas vesículas sinápticas e a perda do gradiente leva a inibição e a 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 Mg²⁺ presente no canal do receptor NMDA e o influxo de Ca²⁺ para o meio intracelular. O acúmulo de Ca²⁺ 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.

3.1.4 Inflamação e o Sistema Nervoso Central

A inflamação pode ser definida como uma resposta do sistema imunológico a danos celulares e teciduais causados por infecções ou estímulos nocivos de origem química ou física. A resposta inflamatória tem como principal função proteger o organismo contra infecções, bem como reparar os tecidos após eventuais danos (Haanen, 1995).

As manifestações externas da inflamação, chamadas de sinais cardinais, resultam das alterações vasculares e do recrutamento das células: calor, rubor e tumor. Os dois sinais cardinais adicionais da inflamação aguda, dor e perda da função, ocorrem como conseqüências da elaboração do mediador e da lesão mediada por leucócitos. Quando o agente infeccioso é eliminado e os mecanismos antiinflamatórios tornam-se ativos, o processo cede e o hospedeiro retorna a um estado normal de saúde (Abbas, 2008).

Reações inflamatórias no SNC parecem surgir a partir da ativação de ambos os ramos do sistema imunológico, ou seja, sistema imunológico inato e adaptativo. No cérebro de roedores, mediadores inflamatórios são produzidos durante atividade epilética pela microglia, astrócitos e neurônios como parte do mecanismo imunológico inato. Em tecido epilético humano, evidências sugerem que tanto a imunidade adaptativa quanto a inata contribuem pra a indução e perpetuação da inflamação no cérebro (Nguyen, 2002). A barreira hemato-encefálica parece desempenhar um papel crucial na modulação da comunicação funcional entre a imunidade inata e adaptativa do SNC, por regular a entrada de sangue de origem de células imunológicas, antígenos e anticorpos para o cérebro (Ransohoff, 2003).

Uma questão crucial é saber se, no cérebro, a inflamação é um componente da etiologia da epilepsia, uma conseqüência de convulsões e dano celular, ou ambos, e se a inflamação pode contribuir para a progressão da doença (Pitkanen, 2002).

Na tentativa de solucionar estas questões, investigações em modelos experimentais de crises convulsivas focaram, em primeiro lugar, o curso de eventos que ocorrem no cérebro dos roedores após a indução de convulsões (Vezzani, 2005). Esforços tem sido dedicados a descrever a localização e a expressão de células específicas de moléculas pró-inflamatórias e sua sinalização no cérebro, e os padrões de disseminação e convulsões associadas a perda neuronal. Estudos

funcionais e farmacológicos mostram que as citocinas podem diminuir o limiar para a indução da convulsão e / ou prolongar a duração das crises convulsivas. Além disso, citocinas e mediadores inflamatórios afetam a sobrevivência neuronal, induzem proliferação celular glial, modificam a permeabilidade da barreira hemato-encefálica e inibem a neurogênese (Allan, 2001).

Resultados experimentais têm mostrado um papel duplo para a inflamação no SNC, podendo ser neuroprotetora (por reduzir a infecção) ou neurotóxica, por ativar mecanismos endógenos de excitotoxicidade (Stoll, 2000; Allan, 2001; Nguyen, 2002). Os efeitos neurotóxicos das citocinas e de outros mediadores inflamatórios parecem ser mediados pela sua capacidade de provocar um aumento de glutamato extracelular, por liberação e/ou inibição da recaptação do neurotransmissor. Como decorrência do acúmulo do glutamato extracelular, há um aumento na atividade dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e ativação de mecanismos intracelulares envolvidos na produção de espécies reativas e de outros mediadores inflamatórios, como ácido araquidônico e óxido nítrico (Allan, 2001).

A administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) desencadeia uma resposta inflamatória semelhante àquela desencadeada por microorganismos infecciosos no hospedeiro. Este fenômeno consiste na resposta imunológica inata, que pode eventualmente progredir para resposta imunológica adaptativa mediada por ativação de linfócitos recrutados para o sangue (Nguyen, 2002; Rivest, 2003). O SNC mostra uma reação imunológica inata bem organizada em resposta não somente à infecção, mas também a uma variedade de insultos cerebrais. Em particular, citocinas como a interleucina IL-1 β , fator de necrose tumoral (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).

Estudos bioquímicos têm mostrado que IL-1 β pode facilitar a neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que esta citocina inibe a recaptação de glutamato por astrócitos. O aumento nos níveis extracelulares de glutamato ativaria o receptor NMDA, causando o influxo de cálcio através deste receptor. Além de aumentar os níveis extracelulares de glutamato, a IL1 β induz a fosforilação da subunidade NR2A e NR2B do receptor NMDA, aumentando o fluxo de cálcio induzido por NMDA (Viviani, 2003). Além disso, a IL1 β diminui as correntes mediadas por GABA em culturas de neurônios hipocámpais (Wang, 2000), o que também aumenta 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 intracerebroventricular de TNF- α 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).

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 drogas antiinflamatórias (Sayyah, 2005). IL-1 β e TNF- α tem um papel importante na sensibilização do SNC relacionados à convulsão e infecção em roedores causados por *Shigella dysenteriae* ou *Streptococcus pneumoniae*.

3.1.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, e altamente tóxica por ser um radical livre (Guix, 2005). No processo de formação de NO, o aminoácido não essencial L-arginina, é transformado em um intermediário (N^G-hidróxi-L-arginina) na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e Ca²⁺. Esta reação ocorre na presença de oxigênio molecular e o resíduo guanidino da L-arginina produz o radical livre gasoso, óxido nítrico, e L-citrulina, em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Kuo, 1992).

As NOS são dependentes de oxigênio, NADPH, flavinas e biopterina para exercer suas atividades. Até o presente momento, foram isoladas e clonadas 3 isoenzimas: a óxido nítrico sintase neuronal (NOS_n) (Schmidt, 1992), óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e) (Marsden, 1993), e a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS_i) (Galea, 1992; Lee, 1993).

A enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) não é expressa constitutivamente, sendo induzida, em macrófagos e outras células, por lipopolisacarídeos bacterianos e/ou citocinas (Lee, 1993; Galea, 1992).

NOSi é a isoforma que contribui para a exacerbação das condições inflamatórias e degenerativas, sendo capaz de produzir óxido nítrico por um longo tempo e conseqüentemente a formação de espécies reativas ao nitrogênio (RNS) (Madrigal et al., 2006). Sob este ponto de vista, modelos animais modificados geneticamente têm contribuído significativamente para a compreensão da etiopatologia das epilepsias (Buchhalter, 1993). Estudos com camundongos nocaute para NOSi mostraram que estes animais atingem o estado de abrasamento induzido por PTZ de uma forma mais lenta que os animais selvagens (De Sarro et al., 1996; De Luca et al., 2005, 2006).

Recentemente, um estudo com convulsões induzidas por MMA em camundongos nocautes para NOSi, mostrou que estes animais tiveram uma duração das convulsões menor do que os animais selvagens, e não houve diferença na latência para a primeira convulsão entre os dois grupos (NOSi^{-/-} e selvagem). Ainda, o MMA não aumentou o conteúdo de NOx nos camundongos iNOS^{-/-}. Por outro lado, os níveis de 3-NT e da inibição da enzima Na⁺,K⁺-ATPase foram maiores nos animais selvagens (Ribeiro et al, 2009).

Quando o NO é produzido em grandes quantidades, este radical livre deixa de exercer seus efeitos como neuromodulador fisiológico e passa a ser um agente neurotóxico (Guix, 2005). Tem sido observado que a exagerada produção de NO neuronal é resultado de uma ativação da enzima NOSn seguido de uma persistente estimulação de receptores, principalmente glutamatérgicos bem como uma excessiva estimulação da enzima NOSi por diversos agentes, como endotoxinas e citocinas (Charbier et al., 1999). O excesso de NO produzido pela NOSi induz lipoperoxidação e reage com grupos tióis da glutatona formando os grupos S-nitrosotióis (Fredstrom, 2002). A formação destes grupos induz a inibição de diversas enzimas responsáveis pela manutenção da viabilidade celular, como a Na⁺,K⁺-ATPase, caspases, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e creatina quinase (Beckman, 1996; Clancy, 1995; Kang, 2000). Esta inibição se deve a presença nestas enzimas de grupos sulfidril que são, particularmente, sensíveis à formação dos grupos S-nitrosotióis induzidos pela geração de NO (Barriviera, et al., 2001).

Royes e colaboradores (2005) verificaram que a injeção intra-estriatal de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, não teve efeito *per se* sobre os parâmetros comportamentais dos ratos, nem sobre o conteúdo estriatal de grupos carbonil protéicos, em um modelo de convulsão induzido por metilmalonato. Entretanto, a administração de pequenas doses de L-NAME aumentou a latência para as convulsões, atenuando a duração dos episódios convulsivos e protegendo contra a carbonilação protéica induzida pelo MMA, enquanto que a maior dose de L-NAME não teve efeito protetor. Desta forma, foi sugerido que baixas doses de L-NAME inibiriam, preferencialmente, a enzima NOS_n, enquanto que altas doses deste composto afetariam a atividade da NOS_e, levando a um efeito vascular adverso (vasoconstrição) e conseqüente agravamento do estresse metabólico. Além disso, a administração de 7-nitroindazol, um inibidor preferencial da NOS neuronal, aumentou as convulsões e a carbonilação de proteínas induzida pelo MMA (Royes, et al., 2007), sugerindo uma contribuição diferencial das isoformas da NOS induzida e carbonilação de proteína nas convulsões induzidas por MMA.

3.2 Ciclooxygenases e Prostaglandinas

A descoberta das prostaglandinas e da ciclooxigenase ocorreu em 1930, quando dois ginecologistas americanos, Kurzrok e Lieb, observaram que fatias do miométrio uterino podiam se contrair ou relaxar em contato com sêmen (Kurzrok and Lieb, 1930). Após, o sueco Von Euler e o inglês Goldblatt descreveram de maneira independente que o líquido seminal e das glândulas reprodutivas acessórias tinham atividades vasorelaxantes e também possuíam atividade de contrair o músculo liso (Goldblatt, 1935; von Euler, 1936). Von Euler identificou o composto ativo como uma substância lipídica ácida solúvel, a qual ele denominou de prostaglandina, por acreditar que fosse biossintetizada pela próstata (Von Euler, 1936).

Bergstroem and Samuelsson, na década de 60, descobriram que a prostaglandina de Von Euler era, na verdade, uma família de substâncias com estrutura química semelhante, os eicosanóides, e as primeiras estruturas químicas dos membros desta família começaram a ser elucidadas com a descrição das estruturas químicas da prostaglandina E₁ (PGE₁) e da prostaglandina F_{1α} (PGF_{1α}). A partir disto, várias descobertas foram feitas, e dentre estas, uma que isolou e

identificou os endoperóxidos cíclicos instáveis: prostaglandina G_2 (PGG_2) e prostaglandina H_2 (PGH_2), e mais tarde elucidou-se a estrutura do tromboxano B_2 (TXB_2), e, posteriormente a descoberta da prostaciclina (PGI_2).

O termo eicosanóide vem do fato de que estas substâncias são derivadas de ácidos graxos essenciais poliinsaturados com 20 carbonos (do grego eicosi = vinte), por exemplo, o ácido araquidônico (AA) [20:4 (5,8,11,14)]. O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado encontrado normalmente na forma esterificada em fosfolípídeos de membrana celular e se origina diretamente de fontes alimentares ou da conversão, nos mamíferos, a partir do ácido graxo essencial, o ácido linoléico (Bergstroem, et al., 1964).

Apesar de não se encontrarem pré-formados no interior das células, os prostanóides (prostaglandinas e tromboxano) podem ser sintetizados rapidamente em resposta a diferentes estímulos. Os eicosanóides são considerados autacóides, ou seja, substâncias geradas localmente, que têm meia-vida curta (segundos) e que exercem localmente os seus efeitos (Campbell e Halushka, 1996). Os prostanóides são sintetizados em uma série de tecidos e atuam como mediadores autócrinos ou parácrinos para sinalizar mudanças imediatas de função celular (Dubois, et al., 1998; Hata and Breyer, 2004).

Através de estímulos físicos, mecânicos e/ou produzidos por diversos mediadores, o ácido araquidônico é liberado por ação de acil-hidrolases, particularmente da fosfolipase A_2 (PLA_2) (Needleman, et al., 1986; Akiba and Sato, 2004). O ácido araquidônico livre é então metabolizado pelas enzimas ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX) para produzir prostanóides e leucotrienos, respectivamente (Yedgar, et al., 2000).

A cicloxigenase (COX) (E.C. 1.14.99.1), também chamada de prostaglandina H_2 sintase (PGHS), foi identificada como a principal enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em PGH_2 em 1972 (Smith and Lands, 1972), e purificada em 1976 a partir de vesículas seminais de ovelha (Hemler, 1976; Miyamoto, 1976). Embora a velocidade de síntese de PGH_2 dependa primariamente da disponibilidade de ácido araquidônico livre, a ciclooxigenase é considerada a enzima limitante da velocidade na rota de biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico.

A PGHS é uma enzima bifuncional que catalisa tanto a bis-oxigenação do ácido araquidônico para formar prostaglandina G_2 (PGG_2), quanto à subsequente

redução peroxidativa da PGG_2 para formar PGH_2 , ambos compostos altamente instáveis (Smith and Marnett, 1991; Smith and Dewitt, 1996).

A PGH_2 formada é o substrato para outras enzimas prostaglandina sintetases ou isomerases, que são as responsáveis pela produção de cinco principais prostanóides bioativos gerados in vivo: PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2 . As enzimas sintetases são expressas com alguma seletividade tecidual e geram diferentes prostaglandinas dependendo do tipo de célula (FitzGerald, 2003; Hata and Breyer, 2004). Por exemplo, na presença de PGE_2 sintetase é gerada a PGE_2 , enquanto outras sintetases específicas dão origem aos diferentes grupos de prostanóides. A figura 3 ilustra como, na presença de sintetases específicas, são gerados os diferentes prostanóides.

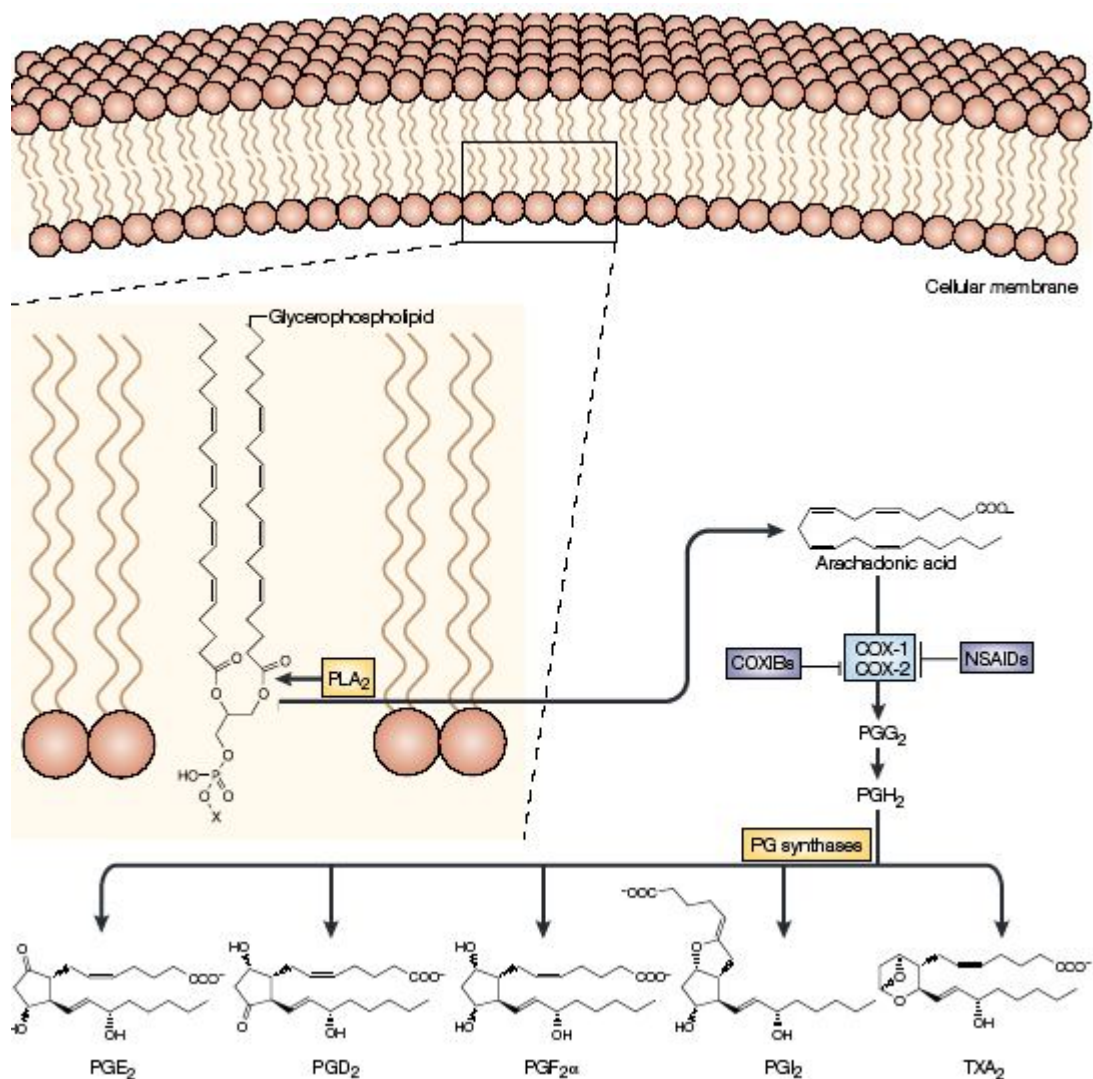


Figura 3: Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A₂. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). No passo seguinte, a ciclooxigenase catalisa a formação PGG₂, e em seguida a redução deste à PGH₂. O PGH₂ é

subsequentemente convertido em uma série de prostaglandinas, incluindo PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e tromboxano A_2 (TXA_2), pela atividade de sintases específicas. Duas isoformas de ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) estão caracterizadas em mamíferos, e a inibição não-seletiva das isoformas é o principal mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs), ao passo que a inibição seletiva da COX-2 é o principal mecanismo de ação dos NSAIDs da família dos COXIBs. A existência de uma terceira isoforma de ciclooxigenase (COX-3) foi proposta recentemente. A COX-3 seria um alvo preferencial para drogas analgésicas/antipiréticas como o paracetamol e dipirona.

Fonte: adaptado de (Gupta and Dubois, 2001).

A enzima ciclooxigenase existe em duas principais isoformas (com aproximadamente 60 % de semelhança) e difere na distribuição e expressão nos tecidos (Dubois et al., 1998). Apesar de existirem exceções, a isoforma COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tecidos, enquanto que a expressão de COX-2 é em geral induzida, particularmente em resposta a estímulos inflamatórios. Assim, as prostaglandinas produzidas via COX-1 são usualmente relacionadas com um papel na 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, com contribuição importante não só para o reparo da lesão, mas também para o desenvolvimento da lesão crônica (Smith, et al., 2000; Simmons, et al., 2004). Também se encontra a isoforma COX-2 na forma constitutiva e é expressa no fígado, estômago e cérebro (Hoffmann, 2000). A ciclooxigenase-2 pode usar outros ácidos graxos e endocanabinóides como anandamida e 2-araquidonil-glicerol como substratos. Tem sido proposto que o metabolismo de endocanabinóides pela COX-2 é um mecanismo importante de regulação das funções desses neuromodulares (Kim and Alger, 2004; Slanina and Schweitzer, 2005a; Slanina, et al., 2005b).

Recentemente, foi sugerida a existência de outra isoforma da COX. A enzima recebeu erroneamente a designação de COX-3, pois 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 and Warner, 2006). Esta enzima é expressa principalmente no sistema nervoso central, e parece ser seletivamente inibida por algumas drogas analgésicas/antipiréticas como o paracetamol e a dipirona. Assim, a inibição da COX-3 no cérebro poderia representar um mecanismo

central primário pelo qual estas drogas que possuem atividade antiinflamatória quase nula possam causar analgesia e diminuir a febre (Chandrasekharan, 2002). Contudo, ainda existe controvérsia a respeito da real existência de uma terceira isoforma de COX cataliticamente ativa, e sobre quais seriam suas funções no organismo (Davies, et al., 2004; Simmons, et al., 2004; Kis, et al., 2005).

Em relação à estrutura protéica, há uma diferença crucial no sítio ativo que catalisa a reação de ciclooxigenase, que é o principal sítio para ligação dos antiinflamatórios não esteroidais (Rome and Lands, 1975; Simmons, et al., 2004). Na COX-1 existe uma isoleucina na posição 523 que é substituída por uma valina na COX-2. Esta pequena diferença promove um aumento de cerca 25 % na largura da entrada e um aumento na flexibilidade do bolso catalítico da COX-2 (Kurumbail, et al., 1996). Embora existam outras diferenças na estrutura protéica entre as isoformas, a diferença citada acima é a mais importante para o desenvolvimento de inibidores seletivos para cada uma das isoformas (Kurumbail, et al., 1996), visto que podem ser desenhados inibidores com tamanho suficiente para alcançar o sítio catalítico na COX-2, mas não na COX-1, e assim inibir preferencialmente a COX-2.

Parâmetro	COX-1	COX-2
Peso molecular (kDa)	68	68
Número de aminoácidos	576	587
Tamanho do gene (kb)	22	8.3
Tamanho de mRNA (kb)	2.8	4.0
Localização	MP	MP, MN, MRE
Aminoácido no bolso catalítico	Ile 523/Ile 434/His 513	Val 523/Val 434/Arg 513
Substratos	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato Ácido eicosapentanoico Ácido linolênico Anandamida 2-araquidonil-glicerol

Tabela 1: Principais diferenças entre as isoformas de ciclooxigenase. MP, membrana plasmática; MRE, membrana de retículo endoplasmático; MN, membrana nuclear. Fonte: compilado de (Vane, 1998; Smith, 2000; Simmons, 2004).

Existem pelo menos três isoformas de PGES humanas clonadas e caracterizadas, como PGES associada à membrana (PGES-1m), PGES-2m, e PGES citosólica (PGESc) (Kojima, 2004). A PGESc dependente de glutathione, é expressa constitutivamente e é mais eficiente em metabolizar os produtos da COX-1 quando comparados aos da COX-2 (Claveau, 2003). Por outro lado, a expressão da PGESm é induzida principalmente por estímulos inflamatórios, tem sua expressão reduzida por antiinflamatórios glicocorticóides e é funcionalmente acoplada à COX-2 (Kamei, et al., 2004). Isto sugere que existe uma indução coordenada das enzimas COX-2 e mPGES em processos inflamatórios (Funk, 2001).

De fato, existem inúmeras evidências de que a produção de eicosanóides, como a PGE₂, através da via da COX-2, tem um papel relevante no processo inflamatório. A COX-2 está expressa em muitos tecidos inflamados tais como pacientes com artrite reumatóide (Crofford, et al., 1994), bem como, em vários modelos experimentais de inflamação (Vane, et al., 1994; Anderson, et al., 1996). Por outro lado, altos níveis de PGE₂ são encontrados em exsudatos inflamatórios e a injeção de PGE₂ diretamente dentro do tecido produz uma série de sinais clássicos da inflamação (Williams and Higgs, 1988).

Interessantemente, existe uma série de estudos que sugere que a PGE₂ atua sinergicamente com outros mediadores, como a histamina e bradicinina, especialmente na contribuição à dor e edema associados com processos inflamatórios (Kingston and Greaves, 1985; Williams and Higgs, 1988; Armstrong, et al., 1995). Além dessas ações, a PGE₂ também pode regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em vários tipos celulares (Hinson, et al., 1996; Fiebich, et al., 1997; Williams and Shacter, 1997).

No entanto, além das ações no processo inflamatório, a PGE₂ também está envolvida em diferentes funções fisiológicas. No trato gastrointestinal, a PGE₂ derivada da COX-1 apresenta um papel protetor na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Woo, et al., 1986; Warner, et al., 1999). No aparelho urinário, a síntese de PGE₂ é importante para um funcionamento normal dos rins por preservar o fluxo sanguíneo renal e os níveis de filtração glomerular em situações de estresse fisiológico, modulando o transporte de água e sais no túbulo distal e estimulando a liberação de renina das células justaglomerulares (Breyer and Breyer, 2001).

Apesar da COX ter sido identificada há mais de 20 anos, o maior progresso no entendimento de suas funções tem acontecido na última década. O impulso nas

pesquisas advém do fato dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) terem comprovada eficácia em diversas indicações terapêuticas, mas apresentarem importantes efeitos colaterais, principalmente gastrointestinais.

A partir disto, e sabendo que as enzimas COX-1 e COX-2 são diferentes na sua sensibilidade à inibição por fármacos antiinflamatórios, levou-se ao desenvolvimento de fármacos que inibem seletivamente a COX-2. O assunto ainda é controverso (Warner and Mitchell, 2004), mas os efeitos dos antiinflamatórios seletivos da COX-2 parecem estar associados à menor irritação gastrintestinal comparados com os inibidores não-seletivos. Um dos inibidores seletivos da COX-2 mais utilizados atualmente é o celecoxibe (Celebra™, Pfizer), que está aprovado pela Food and Drug Administration para o tratamento de várias condições inflamatórias, incluindo osteoartrite, artrite reumatóide e dor aguda.

3.2.1 COX-2 e Prostaglandinas no Cérebro

Em 1993 Yamagata e colaboradores, foram os primeiros a descrever a expressão da COX-2 no cérebro. Os níveis basais de COX-2 no cérebro são regulados por atividade neuronal, e são aumentados por estimulação de alta frequência, associada à indução de potencialização de longa duração (Yamagata et al., 1993). Os níveis basais de prostaglandinas (PGs) no cérebro de roedores são baixos (Bertchold-Kranz et al., 1981), mas quando ocorre um estímulo, como uma convulsão, estes níveis aumentam no tecido cerebral (Bertchold-Kranz et al., 1981; Seregi, et al., 1981).

No sistema nervoso central, a COX-2 é encontrada principalmente no córtex, hipocampo, amígdala (Yamagata et al., 1993), hipotálamo, principalmente em 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). É de especial interesse mencionar que no cérebro a COX-2 é considerada metabolicamente acoplada à PGE₂ sintase, já que esta enzima está co-localizada com a COX-2 (Bosetti, et al., 2004).

A maior parte do PGH_2 produzido na reação da COX-2 é rapidamente convertida em PGE_2 , e esta é quantitativamente a principal prostaglandina produzida no cérebro após ativação da COX-2 (Vidensky, et al., 2003; Sang, et al., 2005), implicando a PGE_2 como um efector chave na via de sinalização da COX-2 e tornando difícil uma dissociação entre as funções mediadas pela COX-2 e por esta prostaglandina (Sang and Chen, 2006).

A PGE_2 exerce suas ações pela interação com receptores de membrana específicos, que podem ser divididos em quatro subtipos: EP1, EP2, EP3 e EP4 (Coleman, et al., 1994; Ushikubi, et al., 1998; Narumiya, et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007) e 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 adenilato ciclase ou a fosfolipase C (PLC) (Machwate, et al., 2001). Em relação à ligação da PGE_2 nos receptores EP, ela apresenta em ratos maior afinidade pelos receptores EP3 e EP4 do que por EP1 e EP2 (Boie, et al., 1997).

3.2.2 Papel Fisiológico da COX-2 e da Prostaglandina E_2 no cérebro

A COX-2, e seu principal metabólito, PGE_2 , são expressas de maneira constitutiva em alguns tecidos, como o cérebro (Simmons, et al., 2004), onde participam de processos fisiológicos e patológicos importantes. De fato, há evidências de que a COX-2 e a PGE_2 tenham um papel importante na regulação da temperatura corporal (Ivanov and Romanovsky, 2004) e aprendizado e memória (Teather, et al., 2002).

3.2.2.1 Termorregulação e Febre

A indução e a regulação de febre resultam de uma complexa interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central (Beutler e Beutler, 1992). O centro termoregulatório localiza-se na área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOH) e os neurônios termossensíveis dessa região integram sinais aferentes sobre a temperatura corporal central e periférica e provocam várias respostas comportamentais e fisiológicas, controlando a produção ou dissipação de calor (Boulant, 2000).

Um estímulo invasor ao hospedeiro induz a ativação do sistema imunológico e a liberação de prostaglandina E₂, (Elmqvist, et al., 1996). Assim, as citocinas pró-inflamatórias são liberadas pelos fagócitos na corrente sanguínea e no local do dano (Givalois, et al., 1994; Ross, et al., 1998) e seriam levadas até à APOH ou às suas proximidades, onde estimulariam a expressão da COX-2 e da prostaglandina E sintase microssomal 1 (mPGES-1) (Cao, et al., 1995), que são enzimas catalisadoras da síntese de PGE₂. Altos níveis de PGE₂ na APOH, seriam capazes de induzir mudanças nos circuitos termorregulatórios do SNC e assim produzir febre (Blatteis, 2004, 2005, 2006), pois ela altera a taxa de disparo de neurônios pré-ópticos, provocando uma elevação no termostato endógeno (Aronoff and Neilson, 2001). Como resultado ocorre a inibição de neurônios sensíveis ao calor (promovendo as respostas de conservação de calor) e a excitação de neurônios termoinsensíveis (estimulando a produção de calor), culminando assim com o aumento da temperatura corporal (Blatteis, 2004).

Há estudos mostrando que o receptor subtipo EP3 está envolvido na pirogênese, pois camundongos “nocauteados” para esse receptor falham completamente em apresentar resposta febril tanto à administração de pirógenos endógenos como à de pirógenos exógenos; enquanto camundongos deficientes dos outros subtipos de receptor (EP1, EP2 e EP4) foram ainda capazes de desenvolver febre (Ushikubi, et al., 1998). O subtipo EP3 está localizado no soma e nos dendritos dos neurônios na APOH (Nakamura, et al., 1999; Nakamura, et al., 2000) e é considerado o principal alvo da PGE₂ para sua ação pirogênica (Blatteis, 2004; Nakamura, 2000) em ratos.

3.2.2.2 Aprendizado e Memória

A localização celular da COX-2 na pós-sinapse, e a indução em associação com modelos de aprendizagem e memória, sugerem um papel para a COX-2 na plasticidade neuronal. Adicionalmente, o ácido araquidônico e seus metabólitos tem sido implicados na plasticidade sináptica (Schacher, et al., 1993; Volterra, 1989; Piomelli, 1994). O ácido araquidônico é gerado no córtex em resposta a ativação de receptores glutamatérgicos subtipo NMDA (Dumuis, et al., 1988; Dumuis, et al., 1990; Pellerin and Wolfe, 1991; Yamagata, et al., 1993) e em resposta à estimulação

sináptica em modelo de potencialização de longa duração (LTP) de plasticidade neuronal (Clements, et al., 1991).

Sabendo que a LTP é um importante evento para o processamento de informações (Bliss and Collingridge, 1993), Theather e colaboradores (2002) verificaram que a injeção sistêmica pós-treino de um inibidor seletivo da COX-2 (NS-398), mas não da COX-1 (piroxicam) aumentou o tempo necessário para o animal localizar a plataforma escondida no labirinto aquático de Morris, sugerindo um papel para a COX-2 na consolidação da memória neste tipo de tarefa.

Outro estudo utilizou a infusão intrahipocampal pré-treino de celecoxibe (inibidor seletivo da COX-2), piorou a performance do animal no labirinto aquático de Morris (Rall, et al., 2003), sugerindo que a COX-2 também possui um papel importante na aquisição de um novo aprendizado.

3.2.3. Papel das Ciclooxygenases, PGD₂ e da PGE₂ nas convulsões induzidas por diferentes agentes

As epilepsias são distúrbios neurológicos crônicos comuns, com incidência de 1% na população em geral (Dichter, 2007). O tratamento para as crises convulsivas epilépticas é sintomático, pois os fármacos disponíveis inibem as convulsões, mas não têm efeito antiepileptogênico. Embora muitos tratamentos estejam disponíveis, dedicam-se muitos esforços à descoberta das causas genéticas e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese e propagação de convulsões.

Há evidências neuroquímicas e farmacológicas de que a inflamação pode contribuir para a ocorrência de convulsões, tanto na epilepsia, como em modelos animais de convulsão (Vezzani, 2005). Estudos epidemiológicos mostram que até 80% dos pacientes com malária apresentam convulsões durante a inflamação aguda (Singh, 2008). Além disso, pacientes com encefalite causadas por diversos agentes apresentam convulsões, que podem persistir mesmo após eliminação do agente infeccioso. Curiosamente, tais convulsões são atenuadas por antiinflamatórios (Singh, 2008). Estes dados indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de convulsões, e que mediadores da inflamação são agentes prováveis desta excitabilidade aumentada.

O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídeos das membranas durante as convulsões (Bazan, 1971; Bazan, et al., 1986) e está implicado nas epilepsias.

Convulsões ativam a fosfolipase citosólica A_2 (Visioli, et al., 1994) e induz a expressão da FLA 2_c (Kajiwara, et al., 1996) e COX-2 (Marcheselli and Bazan, 1996). O ácido araquidônico é então acumulado, com a formação de prostaglandinas (Bazan et al., 1986; Birkle and Bazan, 1987). No cérebro de ratos, o RNAm da COX-2 é preferencialmente expresso em neurônios, onde é regulada (Tocco, et al., 1997).

Vários estudos têm demonstrado que as prostaglandinas cerebrais, particularmente a PGE $_2$, aumentam após as convulsões. No entanto, se as prostaglandinas aumentam ou diminuem as convulsões, parece depender do tipo de prostaglandina produzida, do subtipo de receptor prostaglandinérgico presente no tecido e do agente indutor de convulsões (Oliveira, 2008; Chen, 2005; Vezzani, 2005).

3.2.3.1 Cainato

As convulsões induzidas por ácido caínico ou cainato são consideradas um modelo importante de crises parciais com generalização secundária, apresentando características similares às crises desse tipo em humanos, incluindo farmacoresistência (Ben-Ari, 1985; Engel, 2001). Interessantemente, foi demonstrado que os níveis hipocámpais de PGE $_2$ aumentam durante as convulsões induzidas por ácido caínico (Berchtold-Kranz et al., 1981; Baran, et al., 1987), mas que inibidores da COX-2, como o rofecoxibe, facilitam as convulsões induzidas por esse agente convulsivante (Baik, et al., 1999), sugerindo que os efeitos da PGE $_2$ nas convulsões induzidas por cainato é complexo. Todavia, outros inibidores seletivos da COX-2, rofecoxibe e SC58125, mostram efeito protetor contra os danos neuronais causados por cainato (Kunz e Oliw, 2001; Gobbo e O'Mara, 2004).

3.2.3.2 Pilocarpina

Zhang e colaboradores (2008) utilizaram o modelo de estado epilético induzido por pilocarpina em ratos, e verificaram que o uso do inibidor seletivo da COX-2 (celecoxibe) diminuiu a excitabilidade neuronal e impediu a epileptogênese induzida por pilocarpina em ratos. Celecoxibe regulou a reorganização sináptica por inibir a astrogliose e neurogênese ectópica via mecanismo gabaérgico.

Da mesma forma, a administração de celecoxibe 20mg/kg v.o atenua a neurogênese e as convulsões recorrentes induzidas por pilocarpina (Jung, 2006), sugerindo que a COX-2 poderia ter um papel facilitatório nas convulsões crônicas induzidas por este agente, e que a sua inibição poderia prevenir a epileptogênese. Outro trabalho demonstrou que a administração de inibidores da COX-2 pós-convulsão ou seus ligantes receptores prostanóides (Bough, et al., 2004) protegem os neurônios hipocâmpais do dano induzido por pilocarpina. Contudo, resultados negativos também foram descritos com o SC-58236 pós-estatus epilético não altera a epileptogênese (Holtman, 2009).

3.2.3.3 Pentilenotetrazol

No modelo experimental das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), um agente convulsivante clássico de crises generalizadas do tipo ausência e tônico-clônicas, o pré-tratamento com rofecoxibe reverte a convulsão comportamental induzida por PTZ (Akula, 2008). Outros inibidores seletivos da COX-2, como celecoxibe e nimesulida também diminuem as convulsões induzidas por PTZ em ratos (Dhir, 2006a). Da mesma forma, a administração i.c.v. de anticorpos anti-PGE₂ diminuem as convulsões induzidas por este mesmo agente em ratos (Dhir, 2006a; Oliveira, 2008).

Contudo, o efeito de inibidores seletivos da COX-2 sobre as convulsões induzidas por PTZ, também são conflitantes, desde que igualmente a falta de efeito ou um efeito anticonvulsivante dessas drogas foi encontrado. Enquanto Akarsu e colaboradores (2006) mostraram que o inibidor seletivo da COX-2, SC-58236 (20 ou 40 mg/kg, s.c.), não teve efeito sobre as convulsões induzidas por PTZ, Dhir e colaboradores (2006) descreveram que rofecoxibe e nimesulida aumentam a latência para o aparecimento de convulsões clônicas induzidas por PTZ. Assim, o papel da COX-2 nas convulsões induzidas por diversos agentes, incluindo o PTZ, permanecem ainda não definidos, assim como a participação da PGE₂ nesses modelos experimentais.

Quanto aos níveis cerebrais de prostaglandinas encontrados, a inibição seletiva da COX-2 com NS-398 diminuiu os níveis cerebrais de PGE₂, mas não de PGD₂ (Sang, et al., 2005). De acordo, outros autores, verificaram que as convulsões

induzidas por PTZ são aumentadas por um inibidor seletivo da COX-1 (Akarsu, 2006), diminuindo os níveis de PGD₂ mas não de PGE₂.

Além disso, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das convulsões induzidas por este agente convulsivante (Oliveira, 2008) e diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) no hipocampo de ratos (Oliveira, 2009).

Acredita-se que a maioria das ações mediadas pela PGE₂ sejam exercidas após ativação de um de seus receptores, que foram denominados receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 (Narumiya, et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007). Foi demonstrado, recentemente, que a convulsões induzidas por PTZ são moduladas por receptores EP (Oliveira, 2008). Antagonistas de receptores EP1, EP3 e EP4 e um agonista EP2 atenuam as convulsões induzidas por PTZ, constituindo as primeiras evidências na literatura de que ligantes exógenos de receptores EP são capazes de modular convulsões (Oliveira et al., 2008).

Embora tenha sido proposto um papel facilitador para as prostaglandinas, particularmente para a PGE₂ nas convulsões induzidas por PTZ, não há informações na literatura se as prostaglandinas facilitam as convulsões induzidas por metilmalonato. A determinação do envolvimento das prostaglandinas nas convulsões induzidas por metilmalonato é particularmente importante, principalmente tendo em vista que infecções precipitam as crises metabólicas nos pacientes metilmalonicacidêmicos e a ausência de tratamento específico para as convulsões que tais pacientes apresentam. Assim, neste trabalho investigamos se a PGE₂ ou a inibição da enzima COX-2 altera as convulsões induzidas por metilmalonato.

4. CAPÍTULO I

4. CAPÍTULO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados neste item, o qual se apresenta sob a forma de artigo científico (capítulo I). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no mesmo.

4.1. Capítulo I – Prostaglandina E2 potencializa as convulsões induzidas por metilmalonato

Manuscrito submetido para publicação na revista Neuroscience

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Prostaglandin E2 potentiates methylmalonate-induced seizures

Article Type: Research Paper

Keywords: methylmalonate; seizures; prostaglandin E2; celecoxib; inflammation; cyclooxygenase-2

Corresponding Author: Dr. Carlos Fernando Mello, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria, Center of Health Sciences

First Author: Mirian G Salvadori

Order of Authors: Mirian G Salvadori; Anajara T Gomes; Cristina R Banderó; Lívia M Bueno; Vanessa T Bortolucci; Mauro S Oliveira, PhD; Carlos Fernando Mello, PhD

Abstract: Methylmalonic acidemias consist of a group of inherited metabolic disorders caused by deficiency of methylmalonyl-CoA mutase activity that are clinically and biochemically characterized by methylmalonate (MMA) accumulation and neurological dysfunction, including seizures. It is known that metabolic crises in affected patients are precipitated by infections. A body of evidence supports that MMA causes seizures and that inflammation may contribute for the occurrence of seizures in various forms of epilepsy and animal models of seizures. However, it is not known whether inflammatory mediators facilitate MMA-induced seizures. In this study we showed that while prostaglandin E2 (100 ng/2 µL, i.c.v.) facilitates, the administration of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib (2 mg/kg, p.o.) decreases MMA-induced seizures. The inhibitory effect of celecoxib against MMA-induced seizures was prevented by the administration of prostaglandin E2. These results support a role for eicosanoids, particularly PGE2, in the seizures elicited by this organic acid, which is in full agreement with the view that infections precipitate and exacerbate neurological dysfunction in methylmalonic acidemic patients.

Prostaglandin E₂ potentiates methylmalonate-induced seizures

Mirian Graciela Silva Stiebbe Salvadori^{1,2}, Anajara Teixeira Gomes¹, Cristina Ruedell Reschke Banderó^{1,2}, Livia Maronesi Bueno¹, Vanessa Trindade Bortoluzzi¹, Mauro Schneider Oliveira^{1,2}, Carlos Fernando Mello^{1,2}*

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia,

²Programa de Pós-graduação em Farmacologia

Centro de Ciências da Saúde,

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

*Corresponding author:

Dr. Carlos Fernando de Mello

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL.

FAX: +55 55 3220 9378

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

Abbreviations:

ANOVA, analysis of variance;

CNS, central nervous system;

COX, cyclooxygenase;

EEG, electroencephalogram;

i.c.v., intracerebroventricular;

IL-6, interleukin 6

IL-1 β , interleukin 1 β

MMA, methylmalonate

NMDA, *N*-methyl-D-aspartate;

NO, nitric oxide

PBS, sterile phosphate-buffered saline;

PGD₂, prostaglandin D₂;

PGE₂, prostaglandin E₂;

PGF₂, prostaglandin F₂

PTZ, pentylenetetrazole;

Summary

Methylmalonic acidemias consist of a group of inherited metabolic disorders caused by deficiency of methylmalonyl-CoA mutase activity that are clinically and biochemically characterized by methylmalonate (MMA) accumulation and neurological dysfunction, including seizures. It is known that metabolic crises in affected patients are precipitated by infections. A body of evidence supports that MMA causes seizures and that inflammation may contribute for the occurrence of seizures in various forms of epilepsy and animal models of seizures. However, it is not known whether inflammatory mediators facilitate MMA-induced seizures. In this study we showed that while prostaglandin E₂ (100 ng/2 μL, i.c.v.) facilitates, the administration of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib (2 mg/kg, p.o.) decreases MMA-induced seizures. The inhibitory effect of celecoxib against MMA-induced seizures was prevented by the administration of prostaglandin E₂. These results support a role for eicosanoids, particularly PGE₂, in the seizures elicited by this organic acid, which is in full agreement with the view that infections precipitate and exacerbate neurological dysfunction in methylmalonic acidemic patients.

Key words: methylmalonate; seizures; prostaglandin E₂; celecoxib; inflammation; cyclooxygenase-2

Introduction

Methylmalonic acidemia comprise a group of inherited metabolic disorders caused by either a deficiency of the mitochondrial enzyme methylmalonyl-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2), or defects in the synthesis of 5-deoxyadenosylcobalamin, the cofactor of MCM. Deficient MCM activity, which physiologically catalyses the reaction of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA, leads to the primary accumulation of methylmalonyl-CoA and secondary accumulation of other metabolites, such as methylmalonate, propionate, 3-hydroxypropionate and 2-methylcitrate (Fenton and Rosenberg, 1995; Kolker et al., 2003; Okun et al., 2002). Methylmalonyl-CoA deficiency is associated to neonatal or infantile ketoacidosis, failure to thrive, chronic renal failure, cardiomyopathy, infections and neurological dysfunction, including seizures. (Fenton and Rosenberg, 1995; Morath et al., 2008; Touati et al., 2006). In fact, affected infants may become debilitated and septic rather quickly (Burton, 1998), and sepsis may contribute for the neurological deterioration of the patients.

A significant body of pharmacological and neurochemical evidence supports that inflammation may contribute for the occurrence of seizures in various forms of epilepsy and animal models of seizures (Vezzani and Granata, 2005). It has been shown that up to 80% of the patients with malaria present convulsions during the acute inflammation (Singh and Prabhakar, 2008). Moreover, patients with encephalitis caused by diverse agents present convulsions, that can persist after the elimination of the infectious agent and are attenuated by antiinflammatory drugs (Singh and Prabhakar, 2008).

Cyclooxygenases (COXs) are enzymes that convert arachidonic acid (AA) to prostaglandins (PGs), prostacyclin and thromboxanes (TXs) (Simmons et al., 2004; Pierre et al., 2007). Two major isoforms, COX-1 and COX-2, have been described (Simmons et al., 2004; Takemiya et al., 2006; Vane et al., 1998). In the CNS, COX-2 is localized in excitatory neuron dendrites (Kaufmann et al., 1997) of pyramidal neurons of the hippocampus and cortex, and in the amygdala (Yamagata et al., 1993). Increasing evidence suggests that COX-2 plays a role in seizures and epilepsy (Vezzani and Granata, 2005). For instance, patients with temporal lobe epilepsy and seizure-prone E1 mice present increased COX-2 in the brain (Okada et al., 2001; Desjardins et al., 2003), and COX-2 overexpression facilitates kainate-induced convulsions (Kelley et al., 1999). Moreover, pharmacological treatments that increase COX-2 expression, such as IL-1 β and lipopolysaccharide exposure facilitate bicuculline- and pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures (Akarsu et al., 2006; Vezzani et al., 2000). Accordingly, while PGE₂ facilitates, selective COX-2 inhibitors and EP1, EP3 and EP4 antagonists attenuate PTZ-induced seizures (Oliveira et al., 2008a; Oliveira et al., 2008b). These studies corroborate the electrophysiological findings that

PGE₂ increases frequency of firing, extracellular postsynaptic potential amplitude and temporal summation in slices treated with NS-398 (Chen and Bazan, 2005).

Since there is evidence that infection and/or inflammation mediators facilitate metabolic crises and neurological dysfunction in methylmalonic acidemic patients, in this study we investigated whether PGE₂ and the selective COX-2 inhibitor celecoxib alter behavioral and/ electrographic seizures induced by intracerebroventricular administration of MMA.

Experimental procedures

Animal and reagents

Adult male Wistar rats (270–300 g) maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. Experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. They followed the official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee.

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except prostaglandin (PGE₂), which was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Celecoxib was extracted from commercially available capsules (Celebra ®, Pfizer, Brazil). Its identity and purity was checked by nuclear magnetic resonance methods, and was >98%.

Surgical procedure

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 and Watson, 1986). Chloramphenicol (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. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100 µm) were implanted unilaterally into the right hippocampus. Intracerebroventricular infusions were carried out by a guide cannula, which was glued to a multiplon socket, and inserted through a previously opened skull orifice. The coordinates from bregma for implantation of electrodes in the hippocampus were: AP 4 mm, ML 3 mm, V 3 mm from the dura, which corresponds to the CA1 region of hippocampus (Paxinos and

Watson, 1986). The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the guide cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. 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 drug through the cannula. All experiments were performed 3-7 days after the surgical procedure. Drug doses and time of administration were based on previous studies (Oliveira et al., 2008b; Ciceri et al., 2002; Marklund et al., 2005; Paulson et al., 2000).

Protocols of drug administration

The effect of PGE₂ on MMA-induced seizures was investigated by injecting the animals with PGE₂ (100 ng/2 µL, i.c.v.) or vehicle (sterile phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) 15 min before MMA (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.) or NaCl (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.) and monitoring behavioral and EEG changes along time, as described below.

The effect of celecoxib on MMA-induced seizures was investigated by administering celecoxib (0.2; 2 or 20 mg/kg, p.o.) or vehicle (0.1% carboxymethylcellulose in 5% Tween 80, p.o.), 60 min before the injection of MMA (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.) or NaCl (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.) and monitoring behavioral and EEG changes along time, as described below.

If the anticonvulsant action of celecoxib were due to a decreased production of PGE₂ in the brain, it should be reverted by the injection of PGE₂. We investigated this possibility by injecting the animals with celecoxib (2 mg/kg, p.o.) or vehicle 60 min before MMA, and PGE₂ (10 or 100 ng/2 µL, i.c.v.) or vehicle 15 min before MMA (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.).

All intracerebroventricular injections were performed by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below the guide cannula.

EEG recordings

The procedures for EEG recording and intracerebral injection of drugs were carried out as previously described (Cavalheiro et al., 1992). 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 a digital encephalographic equipment (Neuromap EQSA260, Neurotec LTDA, 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 250 Hz) and stored in a PC for off-line analysis, as described below. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves (≥ 1.5 X baseline); multiple sharp waves (≥ 2 X baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 sec ≥ 5 sec); multiple sharp waves (≥ 2 X baseline) in longer spindle episodes (≥ 5 sec); spikes (≥ 2 X baseline) plus slow waves; multispikes (≥ 2 X baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 sec). Rhythmic scratching of the electrode headset rarely caused artifacts, which were easily identified and discarded.

Statistical analysis

The latency for the first behavioral manifestation of seizures (myoclonic jerk), latency for generalized tonic-clonic seizures and total time spent in generalized seizures were analyzed by Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA. *Post hoc* analyses were carried by the Dunn multiple comparison test. Data are presented as median and interquartile ranges. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and P and H values are show only if $P < 0.05$. The mean amplitude of electroencephalographic recordings was analyzed by ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test.

Results

Effect of PGE₂ on MMA-induced seizures

Figure 1 shows that PGE₂ (100 ng/2 μ L i.c.v.) facilitated MMA (2.5 μ mol/2 μ L, i.c.v.)-induced seizures measured as (A) latency for the first behavioral manifestation (myoclonic jerk) [$H(1) = 12.13$; $P < 0.001$] and (B) latency for generalized tonic-clonic seizures [$H(1) = 10,41$; $P < 0.001$]. Interestingly, although PGE₂ decreased the latency for generalized seizures, it also decreased the total time spent in generalized seizures [$H(1) = 4.49$; $P < 0.05$, Figure 1C]. This occurred because those animals that received PGE₂ and MMA presented more severe seizures (see Figure 1C and increased mean amplitude of EEG recordings of MMA-induced seizures in Figures 2C and 2F), which were followed by a longer refractory period, in which these animals presented typical postictal EEG suppression, and did not present seizures. As a consequence, despite its higher susceptibility to the convulsant, the total time spent in generalized seizure was decreased in the PGE₂ + MMA group, compared with vehicle + MMA group. EEG recordings of the seizures elicited by MMA (Figure 2C) were characterized by the occurrence of multispikes plus slow waves and major seizure activity. Multispikes plus slow waves coincided

with myoclonic jerks, which are characteristic of clonic convulsions. 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. Quantitative analysis of EEG recordings revealed that PGE₂ increased the mean amplitude (in μV) of EEG recordings of MMA-induced seizures in the two recording leads in a 20-min observation period [$F(1,10)=11.52$; $P<0.01$ - Figure 3A for hippocampus and $F(1,10)=4.96$; $P<0.05$ – Figure 3B for parietal cortex].

Celecoxib decreases MMA-induced seizures

Fig. 4 A-C shows the effect of increasing doses of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib (0.2; 2 and 20 mg/kg), on the latency for the first behavioral manifestation of seizures (myoclonic jerk), latency for generalized tonic-clonic seizures and total time spent in generalized seizures. Statistical analysis (Kruskal—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test) revealed that celecoxib, at the dose of 2 mg/kg increased latency for myoclonic jerk [$H(3) = 20.03$; $P < 0.001$, Fig. 4A] and the latency for generalized tonic-clonic seizures [$H(3) = 14.10$; $P<0.01$, Fig. 4B]. The total time spent in generalized seizures was also reduced by celecoxib [$H(3) = 19.11$; $P<0.001$, Fig. 4C]. The other doses of celecoxib tested (0.2 or 20 mg/kg) had not effect on MMA-induced seizures. Figure 5 shows the effect of celecoxib (0.2; 2 or 20 mg/kg) on the mean amplitude (in μV) of the electrographic recordings from hippocampus [$F(3,16) = 41.67$; $P<0.001$; Fig. 5A] and parietal cortex [$F(3,16) = 27.07$; $P<0.001$; Fig. 5B] of animals injected with MMA. We found that celecoxib administration did not alter the mean amplitude (μV) of hippocampal and parietal cortex recordings, *per se*. However, celecoxib, at the dose of 2 mg/kg, prevented MMA-induced seizures, and consequent MMA-induced increase of the mean amplitude in the recording leads. Representative EEG recordings depicting the decrease in seizure activity by 2 mg/kg celecoxib are shown in Figure 6 A-D.

PGE₂ reverts the protective effect of celecoxib against MMA-induced seizures

Fig. 7 A-C shows that PGE₂ (10 ng/2 μL or 100 ng/2 μL i.c.v.) reverts the protective effect of celecoxib (2 mg/kg) against MMA-induced seizures, measured as the latency for the first behavioral manifestation of seizures (myoclonic jerk) [$H(5) = 26.12$; $P < 0.001$, Fig. 7A], latency for generalized tonic-clonic seizures [$H(5)=24.74$; $P<0.001$, Fig. 7B] and total time spent in generalized seizures [$H(5) = 20.85$; $P<0.001$, Fig. 7C]. Figure 8 shows the effect of celecoxib (2 mg/kg), PGE₂ and MMA on the mean amplitude (in μV) of the electrographic

recordings from hippocampus [$F(4,62) = 7.16$; $P < 0.001$; Fig. 8A] and parietal cortex [$F(4,62) = 4.32$; $P < 0.005$; Fig. 8B] of animals injected with MMA. The electrographic pattern of the seizures presented by the animals injected with celecoxib + PGE₂ (10 ng/2 μ L or 100 ng/2 μ L) + MMA in this set of experiments is shown in Fig. 9A-C.

Discussion

In this study we showed that while PGE₂ facilitates, the administration of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, decreases MMA-induced seizures. Accordingly, the inhibitory effect of celecoxib against MMA-induced seizures was prevented by the administration of PGE₂.

The presently reported increase of MMA-induced seizures by PGE₂ not only supports the view that inflammatory mediators, such as IL-6 (Campbell et al., 1993) IL-1 β (Ravizza et al., 2008; Vezzani et al., 2008; Vezzani et al., 2000), NO (Ribeiro et al., 2009) and PGE₂ (Oliveira et al., 2008a; Oliveira et al., 2008b) facilitate seizures, but adds pharmacological evidence to the well-known fact that infections (and consequent increase of inflammatory mediators) precipitate metabolic crises and worsening of neurological status of methylmalonic acidemic patients. In this respect, it is particularly interesting to outline that PGE₂ and its receptors have been implicated as negative modulators of Na⁺,K⁺-ATPase (Oliveira et al., 2009), the major determinant of sodium concentration in the cell, and its excitability.

There is a considerable body of evidence supporting a role for COX-2 in the development of seizures. For instance, patients with temporal lobe epilepsy and the genetically epilepsy susceptible E1 mice show increased expression of COX-2 in brain (Desjardins et al., 2003; Okada et al., 2001). It has also been shown that inducible COX-2 facilitates recurrence of seizure in the rapid kindling seizure model (Takemiya et al., 2003) and that the cerebral levels of PGD₂ and PGE₂ increase following PTZ-induced seizures (Takemiya et al., 2003). In line with this view, it has been shown that while the selective COX-2 inhibitors, such as rofecoxib, nimesulide and celecoxib decrease PTZ-induced seizures in rats (Akarsu et al., 2006; Akula et al., 2008; Kunz and Oliw, 2001; Oliveira et al., 2008b), the neuronal overexpression of COX-2 potentiates KA-induced seizure in human COX-2 transgenic mice (Kelley et al., 1999). Accordingly, the exogenous application of PGE₂, but not of PGD₂ or PGF₂, increases frequency of firing, excitatory postsynaptic potentials amplitude and temporal summation in slices treated with the selective COX-2 inhibitor NS-398 (Chen and Bazan, 2005). It has also been demonstrated that PGE₂ increases glutamate release (Bezzi et al., 1998; Sang and Chen, 2006) from astrocytes (Bezzi et al., 1998), further suggesting that PGE₂ controls excitatory transmission in the brain. At last, the involvement of

EP1, EP3 and EP4 receptors in the convulsant action of PTZ was recently reported (Oliveira et al., 2008a), constituting a strong body of evidence supporting a role for prostaglandins, particularly PGE₂, in seizure facilitation.

Interestingly, in this study we report that a selective COX-2 inhibitor can decrease or have no effect on MMA induced seizures, depending on the dose of the administered drug. The single use or administration of a low dose of the COX-2 inhibitor (0.2 mg/kg celecoxib) did not inhibit seizures, probably due to insufficient decrease of PGE₂ production (Baik et al., 1999; Gobbo and O'Mara, 2004). When the dose of celecoxib was increased to 2 mg/kg, a full protective effect of the COX-2 inhibitor against MMA-induced seizures was found (Figure 4). However, further increasing of celecoxib dose to 20 mg/kg resulted in a lack of anticonvulsant effect, replicating, to some extent, the previously reported biphasic effect of celecoxib against PTZ-induced seizures (Oliveira et al., 2008b). Such a biphasic effect of celecoxib can be explained by a lack of selectivity of high doses of the compound, which presents a COX-2 selectivity ratio of IC₅₀ of 7.6. Therefore, since celecoxib, at the dose of 2 mg/kg, fully inhibits COX-2 activity in the brain (Ciceri et al., 2002), it is reasonable that a dose 10 times higher (20 mg/kg) would lack selectivity and inhibit COX-1. Since nonselective and selective COX-1 inhibitors increase seizures (Akarsu et al., 2006; Sanchez-Hernandez et al., 1999), it is possible that the lack of selectivity towards COX-2 would result in a biphasic response also for MMA-induced seizures.

It has been reported that COX isozymes are differently coupled with specific prostaglandin synthases (Ueno et al., 2001; Ueno et al., 2005), being PGE₂ produced preferentially by COX-2 and PGD₂ by COX-1. Therefore, inhibition of COX-2 by celecoxib would result in decreased levels of PGE₂, decreasing MMA susceptibility, as previously described for PTZ (Oliveira et al., 2008b). The role of PGE₂ in the currently described anticonvulsant effect of celecoxib is further supported by the fact that PGE₂ administration prevented the anticonvulsant effect of celecoxib. Therefore, it sounds unlikely that a decrease in brain excitability following COX-2 inhibition is due to alterations in endocannabinoid transmission, in which COX-2 is known to play a role (Kim and Alger, 2004).

In summary, in this study we show that while PGE₂ exacerbates, celecoxib inhibits MMA-induced seizures. These results support a role for PGE₂ in the seizures elicited by this organic acid, and is in full agreement with the view that infections precipitate and exacerbate metabolic crises and neurological dysfunction in methylmalonic acidemic patients. They also indicate that adjunct therapy with antiinflammatory drugs, particularly selective COX-2 inhibitors, may be of value in the clinics, as demonstrated in other neurological diseases in which seizures are associated to an increased inflammatory response (Singh and Prabhakar, 2008).

Acknowledgements

The authors thank Leonardo Rambo for helping to perform blind EEG analysis. Work supported by CNPq (grants: 500120/2003-0, 505527/2004-9 and 472300/2004-0) and CAPES. M.S. Oliveira, M.G.S.S. Salvadori and C.F. Mello are recipients of CNPq fellowships.

Legends

Fig. 1. Effect of PGE₂ (100 ng/2 µL i.c.v.) on the latency for: myoclonic jerk (A) and generalized tonic-clonic seizures (B), and on total time spent in generalized seizures (C) induced by MMA (2.5 µmol/2.5 µL, i.c.v.). Data are presented in seconds, as median and interquartile range (A-B) and as mean and S.E.M. (C). N= 8–9 in each group. **P*<0.01 compared with vehicle group.

Fig. 2. Representative electroencephalographic recordings from the hippocampus (HIP) and parietal cortex (CTX) of a control animal (A-C): preinfusion (A); after the injection of vehicle (PBS, 2 µL - B); after the injection of MMA (2.5 µmol/2.5 µL - C); and a PGE₂-injected animal (D-F): preinfusion (D); after the injection of PGE₂ (100 ng/2 µL - E); after the injection of MMA (2.5 µmol/2.5 µL - F). Black and white arrows indicate MMA injection and beginning of seizures, respectively.

Fig. 3. Effect of PGE₂ (100 ng/2 µL) on the mean amplitude of EEG recordings in the hippocampus (A) and parietal cortex (B) of animals injected with vehicle or MMA (2.5 µmol/ 2.5 µL). N=8-9 in each group. **P*<0.05 when compared with respective vehicle.

Fig. 4. Effect of celecoxib (0.2; 2 or 20 mg/kg, p.o.) on the latency for myoclonic jerk (A), and latency for generalized tonic-clonic seizures (B), total time spent in generalized seizures (C) induced by MMA (2.5 µmol/ i.c.v.). **P*<0.05 compared with vehicle-MMA group (Dunn's multiple comparison test). Data are presented in seconds, as median and interquartile range (A-B) and as mean and S.E.M. (C). N = 6-7 per group.

Fig. 5. Effect of celecoxib (0-20 mg/kg, p.o.) on the mean amplitude of EEG recordings in the hippocampus (A) and parietal cortex (B) of animals injected with vehicle or MMA (2.5 μ mol/ 2.5 μ L). N=6-7 in each group. *P<0.05 when compared with respective vehicle.

Fig. 6. Representative electroencephalographic recordings from the hippocampus (HIP) and parietal cortex (CTX) of animals administered 0.1% carboxymethylcellulose (CMC, p.o. - A) or 0.2 mg/kg (B), 2 mg/kg (C) or 20 mg/kg (D) celecoxib and challenged with MMA (2.5 μ mol/ 2.5 μ L). Since recordings obtained after the administration of celecoxib (and before MMA) did not differ between groups, they were omitted, for the sake of clarity.

Fig. 7. PGE₂ (10 ng and 100 ng/ 2 μ L, i.c.v.) revert the protective effect of celecoxib (2 mg/kg p.o.) on MMA-induced seizures measured as latency for myoclonic jerk (A); latency for generalized tonic-clonic seizures (B); total time spent in generalized seizures (C). *P<0.05 compared with vehicle-MMA group (Dunn's multiple comparison test). Data are presented in seconds, as median and interquartile range (A-B) and as mean and S.E.M. (C). N= 6-7 in each group.

Fig. 8. PGE₂ (10 ng and 100 ng/ 2 μ L, i.c.v.) revert the protective effect of celecoxib (2 mg/kg p.o.) on MMA-induced seizures measured as the mean amplitude of EEG recordings in the hippocampus (A) and parietal cortex (B). N=6-7 in each group. *P<0.05 when compared with respective vehicle.

Fig. 9. Representative electroencephalographic recordings from the hippocampus (HIP) and parietal cortex (CTX) of animals injected with CMC (A); 2 mg/kg celecoxib (B); 2 mg/kg celecoxib plus PGE₂ (10 ng / 2 μ L, i.c.v.) (C). For the sake of clarity, the other groups were omitted.

Figure 1

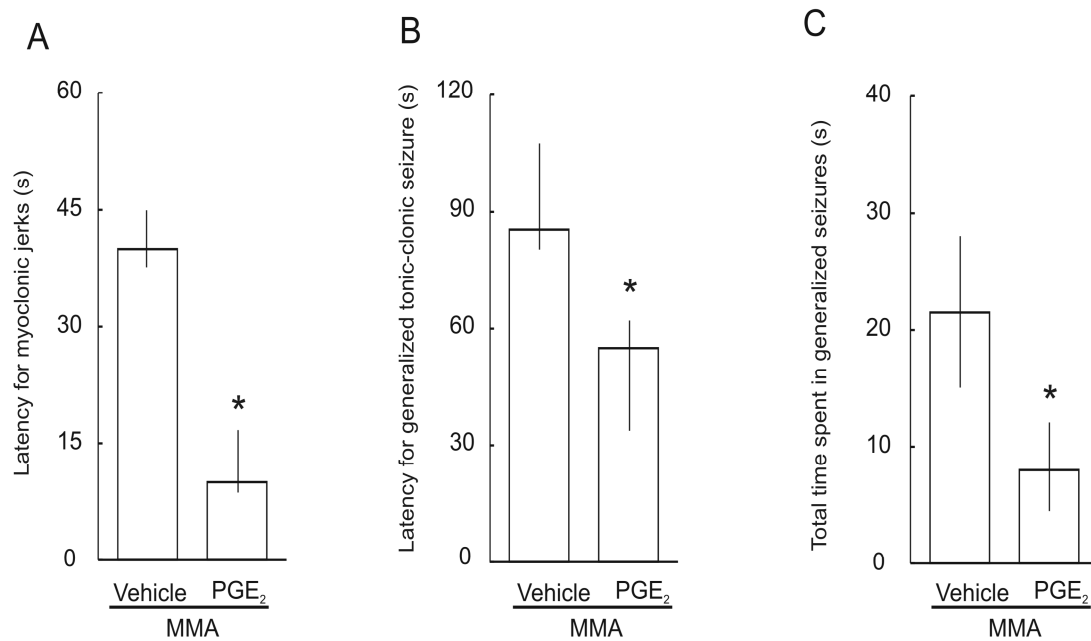


Figure 2

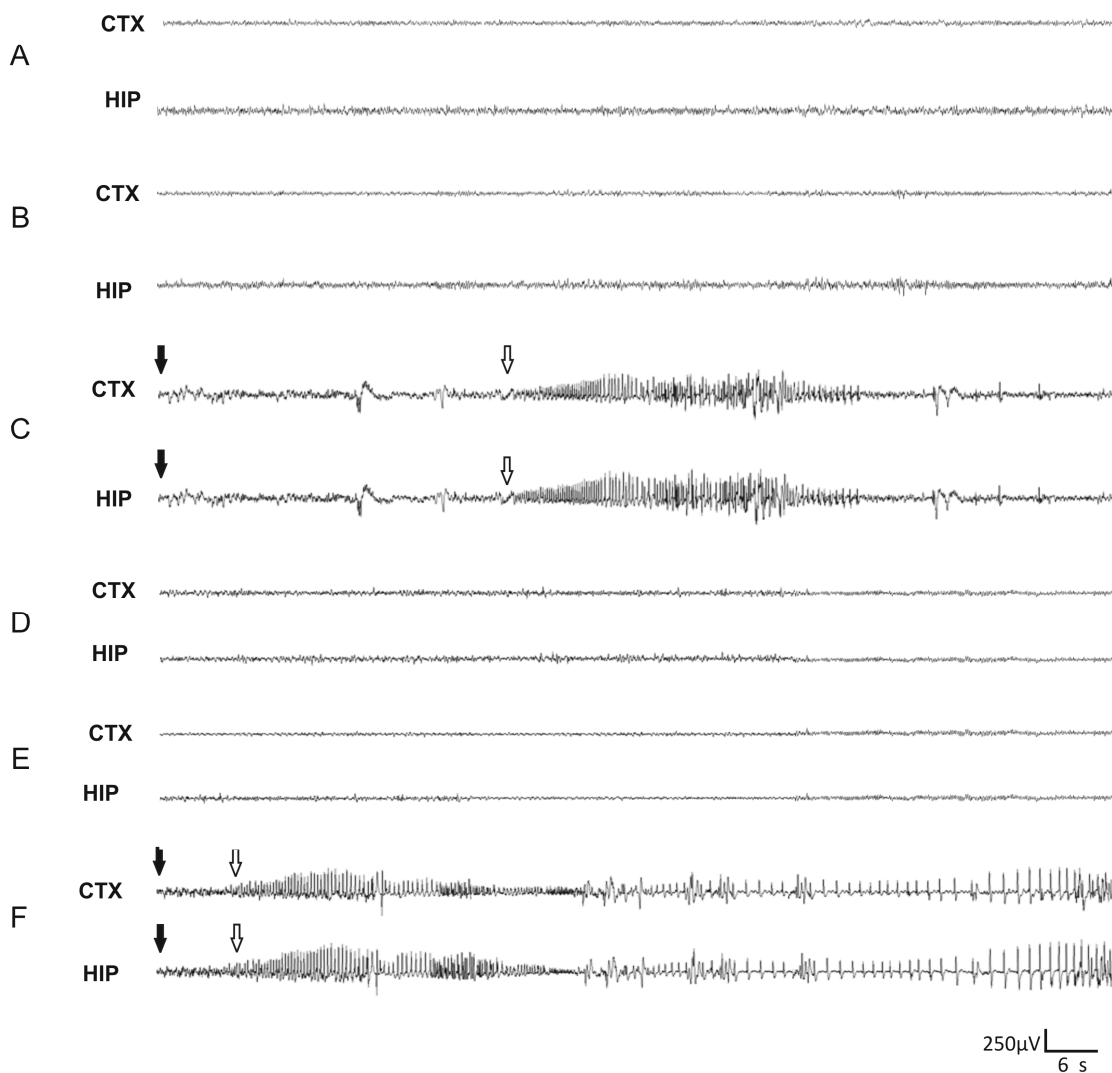


Figure 3

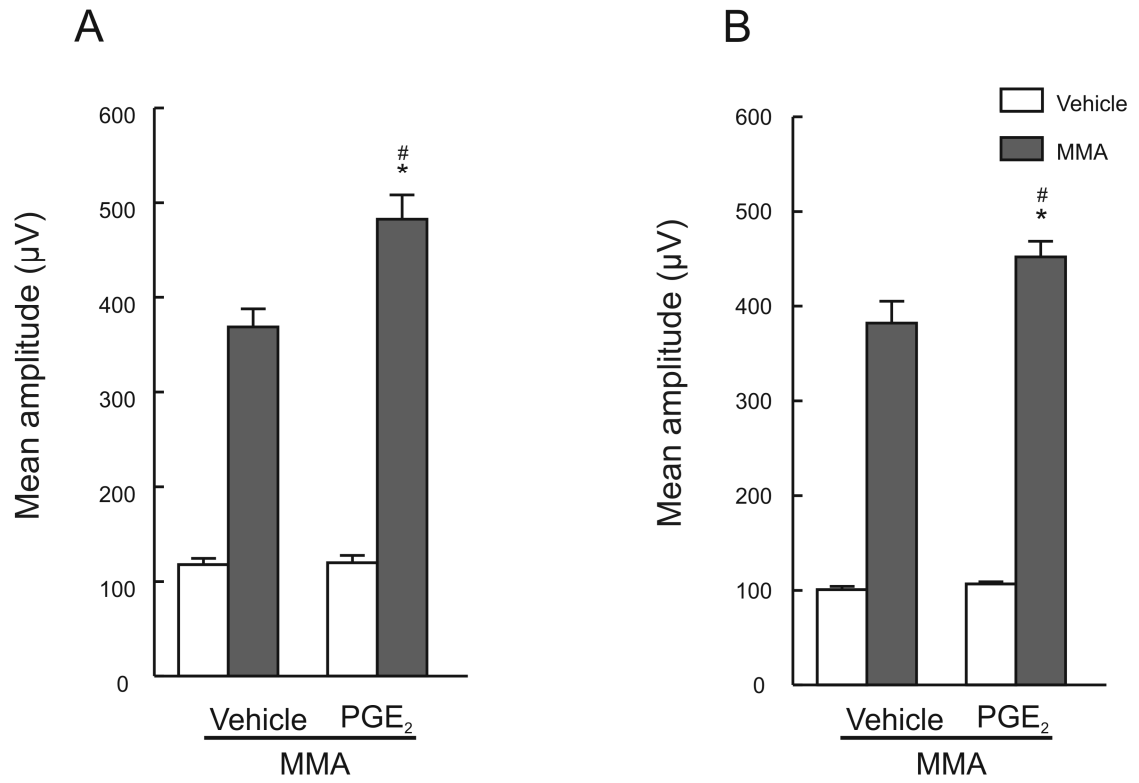


Figure 4

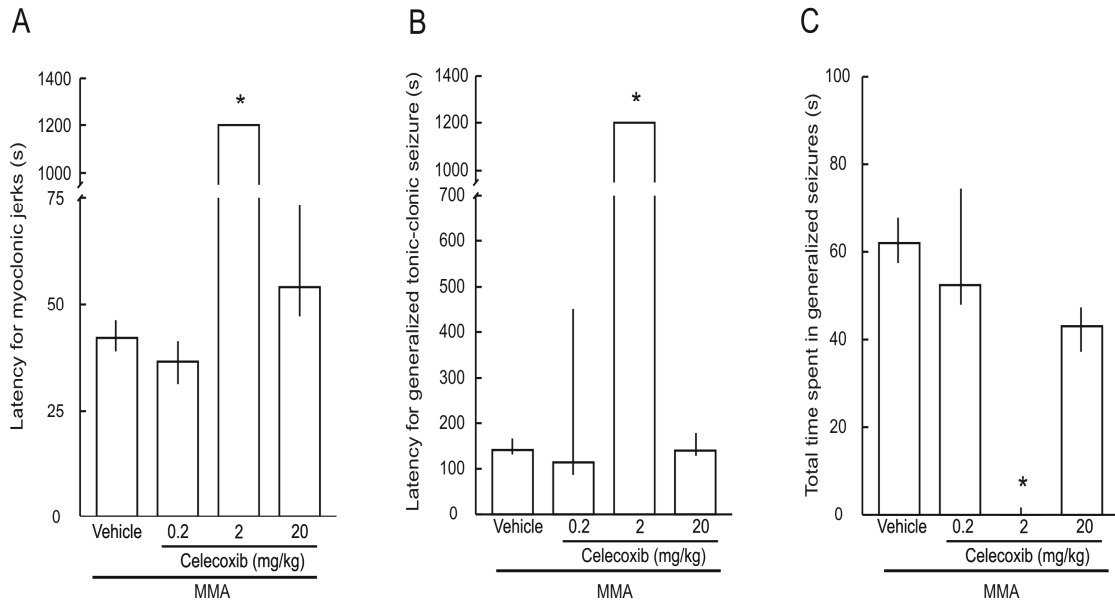


Figure 5

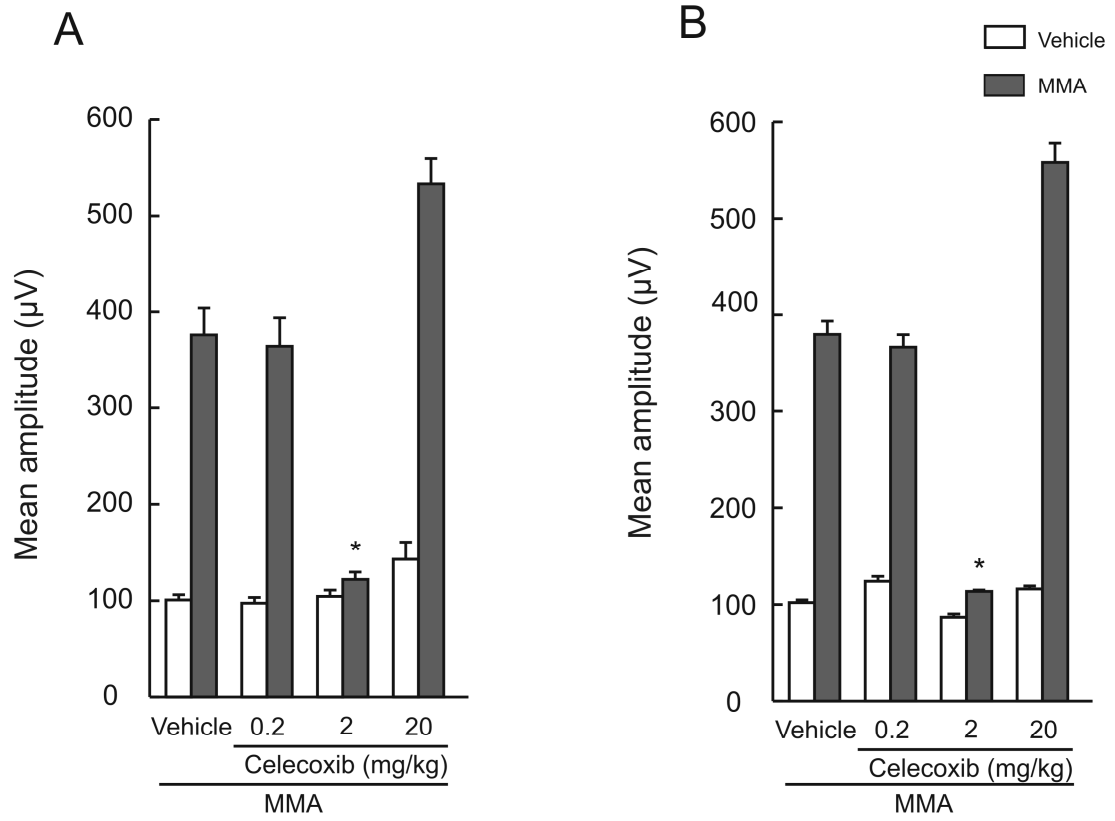


Figura 6

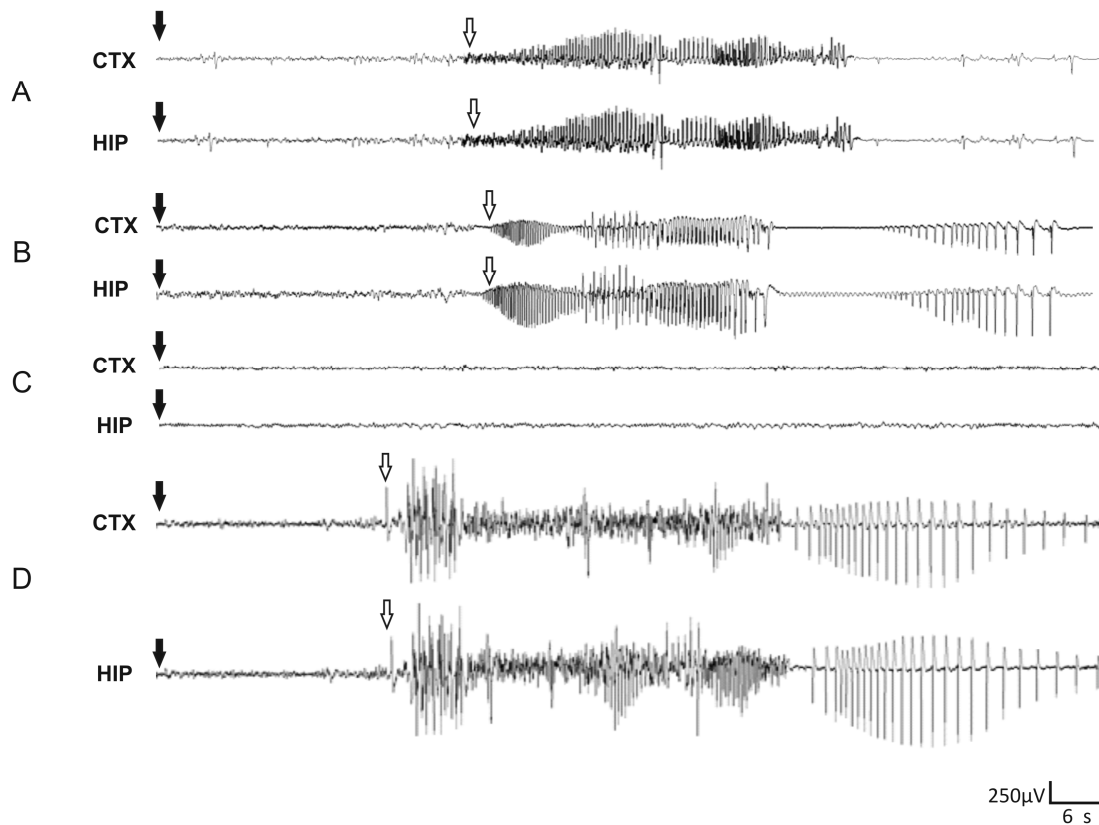


Figure 7

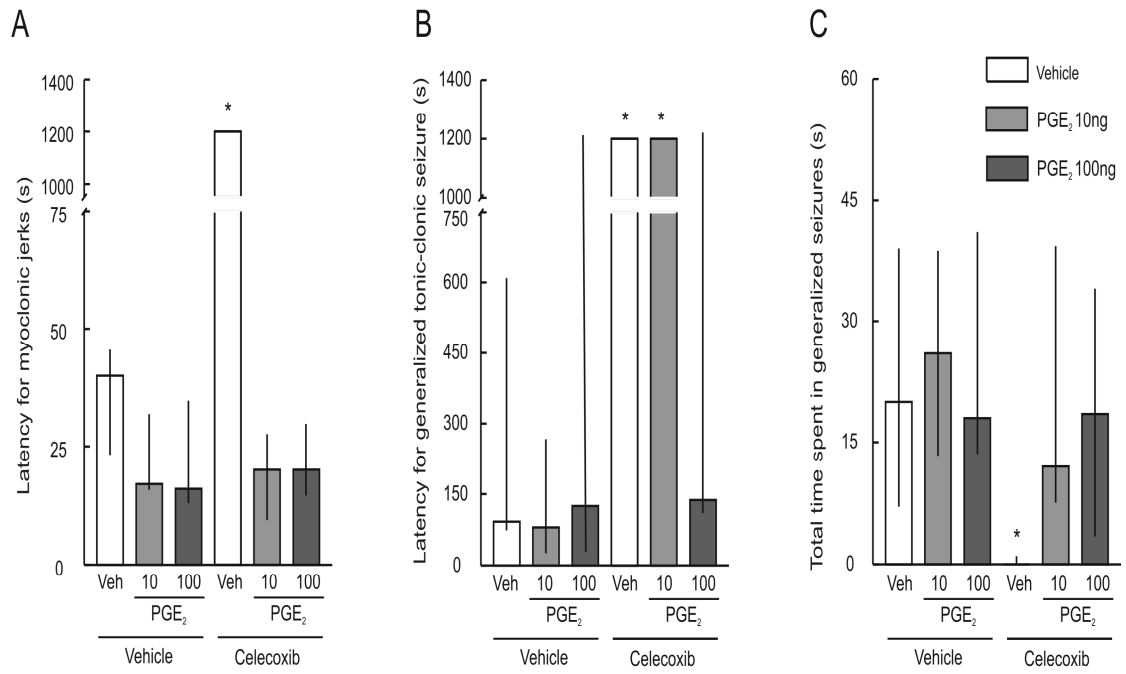


Figura 8

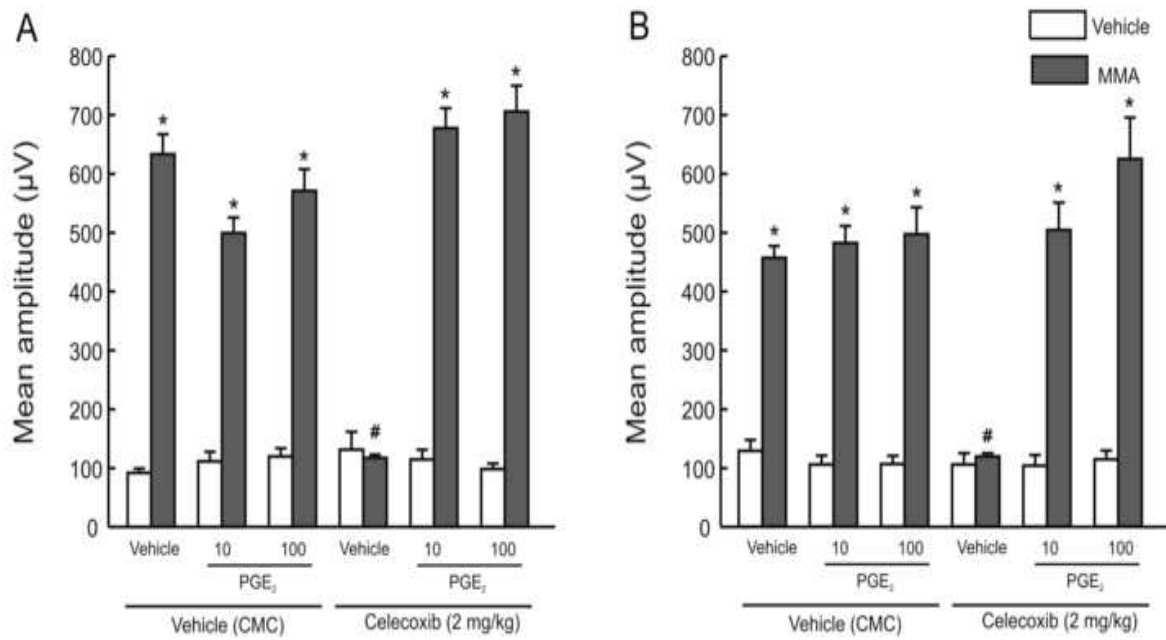
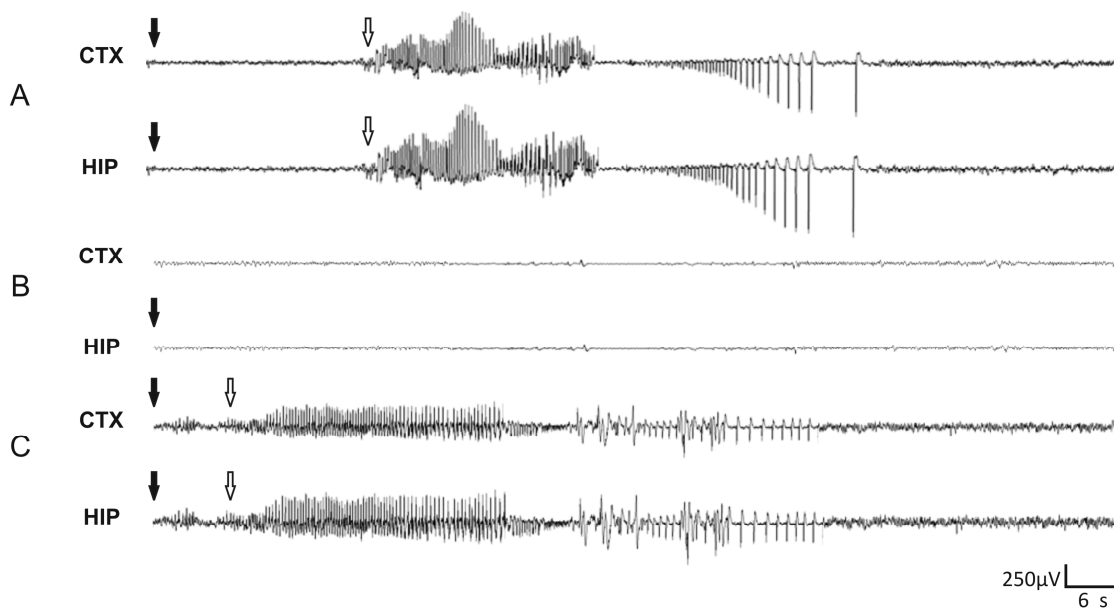


Figure 9



References

- Akarsu, ES, Ozdayi, S, Algan, E, Ulupinar, F, (2006) The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction. *Epilepsy Res* 71:181-187.
- Akula, KK, Dhir, A, Kulkarni, SK, (2008) Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy Res* 78:60-70.
- Baik, EJ, Kim, EJ, Lee, SH, Moon, C, (1999) Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 843:118-129.
- Bezzi, P, Carmignoto, G, Pasti, L, Vesce, S, Rossi, D, Rizzini, BL, Pozzan, T, Volterra, A, (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Burton, BK, (1998) Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* 102:E69.
- Campbell, IL, Abraham, CR, Masliah, E, Kemper, P, Inglis, JD, Oldstone, MB, Mucke, L, (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10061-10065.
- Cavalheiro, EA, Fernandes, MJ, Turski, L, Mazzacoratti, MG, (1992) Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res Suppl* 9:239-247; discussion 247-238.
- Chen, C, Bazan, NG, (2005) Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93:929-941.
- Ciceri, P, Zhang, Y, Shaffer, AF, Leahy, KM, Woerner, MB, Smith, WG, Seibert, K, Isakson, PC, (2002) Pharmacology of celecoxib in rat brain after kainate administration. *J Pharmacol Exp Ther* 302:846-852.
- Desjardins, P, Sauvageau, A, Bouthillier, A, Navarro, D, Hazell, AS, Rose, C, Butterworth, RF, (2003) Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochem Int* 42:299-303.
- Fenton, W.A., Rosenberg, L.E., 1995. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol 1, McGraw-Hill, New York, pp. 1423–1449.

- Gobbo, OL, O'Mara, SM, (2004) Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 125:317-327.
- Kaufmann, WE, Andreasson, KI, Isakson, PC, Worley, PF, (1997) Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 54:601-624.
- Kelley, KA, Ho, L, Winger, D, Freire-Moar, J, Borelli, CB, Aisen, PS, Pasinetti, GM, (1999) Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 155:995-1004.
- Kim, J, Alger, BE, (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7:697-698.
- Kolker, S, Schwab, M, Horster, F, Sauer, S, Hinz, A, Wolf, NI, Mayatepek, E, Hoffmann, GF, Smeitink, JA, Okun, JG, (2003) Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 278:47388-47393.
- Kunz, T, Oliw, EH, (2001) The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:569-575.
- Marklund, N, Keck, C, Hoover, R, Soltesz, K, Millard, M, LeBold, D, Spangler, Z, Banning, A, Benson, J, McIntosh, TK, (2005) Administration of monoclonal antibodies neutralizing the inflammatory mediators tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 does not attenuate acute behavioral deficits following experimental traumatic brain injury in the rat. *Restor Neurol Neurosci* 23:31-42.
- McColl, CD, Horne, MK, Finkelstein, DI, Wong, JY, Berkovic, SF, Drago, J, (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234-243.
- Morath, MA, Okun, JG, Muller, IB, Sauer, SW, Horster, F, Hoffmann, GF, Kolker, S, (2008) Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria- a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* 31:35-43.
- Okada, K, Yuhi, T, Tsuji, S, Yamashita, U, (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible EI mice was increased after seizure. *Brain Res* 894:332-335.
- Okun, JG, Horster, F, Farkas, LM, Feyh, P, Hinz, A, Sauer, S, Hoffmann, GF, Unsicker, K, Mayatepek, E, Kolker, S, (2002) Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277:14674-14680.

- Oliveira, MS, Furian, AF, Rambo, LM, Ribeiro, LR, Royes, LF, Ferreira, J, Calixto, JB, Mello, CF, (2008a) Modulation of pentylenetetrazol-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, Cavaleiro, EA, Mello, CF, (2008b) Cyclooxygenase-2/PGE₂ pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79:14-21.
- 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., and Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Pierre, SC, Schmidt, R, Brenneis, C, Michaelis, M, Geisslinger, G, Scholich, K, (2007) Inhibition of cyclooxygenases by dipyrrone. *Br J Pharmacol* 151:494-503.
- Ravizza, T, Noe, F, Zardoni, D, Vaghi, V, Sifringer, M, Vezzani, A, (2008) Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. *Neurobiol Dis* 31:327-333.
- Ribeiro, LR, Figuera, MR, Oliveira, MS, Furian, AF, Rambo, LM, Ferreira, AP, Saraiva, AL, Souza, MA, Lima, FD, Magni, DV, Dezengrini, R, Flores, EF, Butterfield, DA, Ferreira, J, dos Santos, AR, Mello, CF, Royes, LF, (2009) Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci* 27:157-163.
- Sanchez-Hernandez, MC, Delgado, J, Navarro, AM, Orta, JC, Hernandez, M, Conde, J, (1999) Seizures induced by NSAID. *Allergy* 54:90-91.
- Sang, N, Chen, C, (2006) Lipid signaling and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 12:425-434.
- Simmons, DL, Botting, RM, Hla, T, (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387-437.
- Singh, G, Prabhakar, S, (2008) The effects of antimicrobial and antiepileptic treatment on the outcome of epilepsy associated with central nervous system (CNS) infections. *Epilepsia* 49 Suppl 6:42-46.

- Takemiya, T, Maehara, M, Matsumura, K, Yasuda, S, Sugiura, H, Yamagata, K, (2006) Prostaglandin E₂ produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. *Neurosci Res* 56:103-110.
- Takemiya, T, Suzuki, K, Sugiura, H, Yasuda, S, Yamagata, K, Kawakami, Y, Maru, E, (2003) Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71:205-216.
- Touati, G, Valayannopoulos, V, Mention, K, de Lonlay, P, Jouvet, P, Depondt, E, Assoun, M, Souberbielle, JC, Rabier, D, Ogier de Baulny, H, Saudubray, JM, (2006) Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. *J Inherit Metab Dis* 29:288-298.
- Ueno, N, Murakami, M, Tanioka, T, Fujimori, K, Tanabe, T, Urade, Y, Kudo, I, (2001) Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276:34918-34927.
- Ueno, N, Takegoshi, Y, Kamei, D, Kudo, I, Murakami, M, (2005) Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 338:70-76.
- Vane, JR, Bakhle, YS, Botting, RM, (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Vezzani, A, Balosso, S, Ravizza, T, (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* 22:797-803.
- Vezzani, A, Granata, T, (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46:1724-1743.
- Vezzani, A, Moneta, D, Conti, M, Richichi, C, Ravizza, T, De Luigi, A, De Simoni, MG, Sperk, G, Andell-Jonsson, S, Lundkvist, J, Iverfeldt, K, Bartfai, T, (2000) Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11534-11539.
- Yamagata, K, Andreasson, KI, Kaufmann, WE, Barnes, CA, Worley, PF, (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A acidemia metilmalônica, como já descrito anteriormente, é um erro inato do metabolismo caracterizado pelo acúmulo tecidual de metilmalonil-CoA e propionil-CoA nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados (Scriver, 1995). A deficiência de metilmalonil-CoA está associada à cetoacidose neonatal e infantil, falha de crescimento, insuficiência renal crônica, cardiomiopatia, infecções e disfunção neurológica, incluindo convulsões (Fenton e Rosenberg, 1995; Touati, 2006; Morath, 2008).

Atualmente, o tratamento dos pacientes portadores de acidemia metilmalônica inclui medidas terapêuticas como: a) remoção de toxinas através de transfusões de sangue ou hemodiálise; b) restrição protéica (dieta isenta de aminoácidos valina, isoleucina, leucina, metionina e treonina); c) terapia com vitamina B₁₂, nas acidemias metilmalônicas por deficiência de cofator (Orgier de Baurny e Saudubray, 2002); d) administração de L-carnitina, propiciando a excreção urinária de propionil-carnitina, e redução da toxicidade do propionato (Burns, et al., 1996); e) administração de metronidazol para reduzir os níveis de propionato (Leonard, et al., 2001); f) administração de ascorbato para diminuir os efeitos da deficiência de glutatona (Treacy, et al., 1996).

Estudos recentes utilizando cultura de células neuronais, demonstraram que o uso de drogas que ativam os canais de K⁺, como o diazóxido, é capaz de proteger tecidos isquêmicos, prevenir lesões celulares e teciduais provocadas por ácido metilmalônico (Kowaltowski, et al., 2006).

Considerando que os tratamentos atuais utilizados na terapêutica da acidemia metilmalônica não são completamente eficazes na prevenção das manifestações clínicas, se faz necessária a busca por compostos que possam auxiliar no tratamento desta acidemia.

Nosso estudo nos mostrou que a administração intracerebroventricular de PGE₂ diminuiu a latência para as convulsões induzidas por MMA, mas diminuiu o tempo de duração das mesmas. Por outro lado, a administração de um inibidor da ciclooxigenase-2 diminuiu tanto a duração dos episódios convulsivos, como a latência para convulsões induzidas por MMA. Ainda, o efeito anticonvulsivante do

celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, foi revertido com a administração intracerebroventricular de PGE₂.

O presente estudo revelou que a PGE₂ facilita as convulsões induzidas por MMA, e não só apóia a idéia de que mediadores inflamatórios, como a IL-6 (Campbell, 1993) IL-1 β (Vezzani, 2000; Vezzani, 2008; Ravizza, 2008), NO (Ribeiro, 2009) e PGE₂ (Oliveira, 2008; Oliveira, 2008) facilitam convulsões, mas acrescenta provas farmacológicas para o bem conhecido fato de que infecções e conseqüentemente, o aumento de mediadores inflamatórios precipitam as crises metabólicas e pioram o estado neurológico de pacientes com acidemia metilmalônica. A este respeito é particularmente interessante que a PGE₂ e seus receptores têm sido implicados como moduladores negativos da Na⁺, K⁺-ATPase (Oliveira, 2009), o principal determinante da concentração de sódio na célula e sua excitabilidade.

A hipótese mais aceita para a neurotoxicidade induzida pelo MMA é a inibição metabólica (Dutra et al, 1993; Toyoshima, et al., 1995; Wajner et al, 1992). Há evidências de que o MMA induz convulsões por inibir a SDH e ativar secundariamente receptores NMDA (de Mello, et al., 1996; Royes, et al., 2003), uma vez que as convulsões induzidas por MMA são inibidas por MK-801 e atenuadas por succinato. Além disso, sabe-se que o MMA não interage diretamente com receptores do glutamato (de Mello, et al., 1997), sugerindo, portanto, que a depleção de ATP devido à falência do complexo II seja o evento que desencadeia a excitação que se traduz nas convulsões observadas nos animais injetados com este ácido e talvez, nos pacientes com acidemia metilmalônica. Após a descoberta de que antagonistas glutamatérgicos poderiam proteger contra a perda neuronal induzida por diversos insultos neurológicos, como isquemia e hipóxia, passou-se a admitir que o glutamato endógeno pudesse ser o mediador de processos excitotóxicos quando em altas concentrações na fenda sináptica (Obrenovitch, et al., 2000).

Além disso, diversos estudos sugerem a participação de inibidores metabólicos como a rotenona, cianeto, oxiaminoacetato, 3-nitropropionato, malonato e metilmalonato na toxicidade induzida por glutamato, uma vez que eles facilitam a ativação de receptores NMDA (McDonald and Schoepp, 1993; Brouillet, et al., 1994; Zeevalk, et al., 1995; Behrens, et al., 1995; Pavlakovic, et al., 1995; de Mello, et al., 1997; Royes, et al., 2003; Royes, et al., 2006).

O envolvimento das espécies reativas nas convulsões induzidas pela injeção intraestriatal de MMA foi caracterizado por estudos que evidenciaram uma diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, um aumento na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (indicativo de lipoperoxidação) e carbonilação protéica após a administração deste ácido orgânico no estriado (Malfatti, et al., 2003; Royes, et al., 2006). Também foi demonstrado que as convulsões induzidas por MMA são atenuadas por ácido ascórbico, α -tocoferol e por gangliosídeo GM1, sendo que os dois últimos também inibem a produção de TBARS induzida por MMA intraestriatal. (Figuera, et al., 1999, Figuera, et al., 2003). De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o MMA inibe a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (Wyse, et al., 2000; Malfatti et al., 2003), responsável pela manutenção do gradiente de Na^+ e K^+ através das membranas celulares, o que é essencial para a manutenção do potencial de membrana (Jorgensen and Collins, 1986).

As conseqüências da ativação ou inibição da COX-2 sobre a excitotoxicidade e excitabilidade neuronal dependem do tipo de prostaglandina que são produzidas nas diversas fases da epileptogênese, bem como o envolvimento dos receptores prostanóides. Em particular, PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ estão aumentados no cérebro durante a fase aguda do estado epilético, enquanto PGD_2 aumenta principalmente durante a fase latente, e no período inter-ictal durante crises crônicas (Naffah-Mazzacoratti, et al., 1995).

Estes efeitos aparentemente controversos dos inibidores da COX provavelmente estão relacionados às ações específicas sobre a produção basal de várias prostaglandinas (Baik et al., 1999) e sobre as diferentes prostaglandinas produzidas durante as convulsões nos diversos modelos experimentais. Por exemplo, há evidências de que a PGD_2 tem propriedades anticonvulsivantes, e uma redução dos seus níveis cerebrais poderiam aumentar a excitabilidade, facilitando as convulsões (Akarsu, et al., 1998 e Forstermann, et al., 1998). É possível também que inibidores da COX aumentem as convulsões por outros mecanismos que a inibição da síntese prostaglandinas (Vezzani, 2005).

Um número considerável de estudos indicam um papel para a COX-2 no desenvolvimento de crises convulsivas. Por exemplo, pacientes com epilepsia do lobo temporal e camundongos geneticamente suscetíveis E1 mostram aumento da expressão da COX-2 no cérebro (Okada, et al., 2001; Desjardins, 2003). Foi também demonstrado que a indução da COX-2 facilita a recorrência de crises convulsivas no

modelo de abrasamento (“kindling”) rápido (Takemiya, et al., 2003) e que os níveis cerebrais de PGD_2 e PGE_2 aumentam após as convulsões induzidas por PTZ (Takemiya, et al., 2003). Em consonância com este ponto de vista, tem sido demonstrado que, embora os inibidores seletivos da COX-2, tais como rofecoxibe, celecoxibe e nimesulida diminuam as convulsões induzidas por PTZ em ratos (Akula, 2008; Akarsu, 2006; Oliveira, 2008; Kunz, 2001), a superexpressão neuronal da COX-2 potencializa as convulsões induzidas por cainato em humanos e camundongos transgênicos pra COX-2 (Kelley, 1999). Assim, a aplicação exógena de PGE_2 , mas não de PGD_2 ou PGF_2 , aumenta a frequência de disparo, amplitude do potencial excitatório pós-sináptico em fatias de hipocampo tratadas com o inibidor seletivo de COX-2 NS-398 (Chen, 2005). Também foi demonstrado que a PGE_2 aumenta a liberação de glutamato (Bezzi, 1998; Sang and Chen, 2006) por neurônios e por astrócitos (Bezzi, 1998), sugerindo que a PGE_2 também controla a transmissão excitatória no cérebro. Por último, o envolvimento de receptores EP1, EP3 e EP4 na ação convulsivante de PTZ foi recentemente descrita (Oliveira, 2008), constituindo evidências adicional para um papel para prostaglandinas, particularmente a PGE_2 , na facilitação das convulsões.

Neste estudo, nós descrevemos que um inibidor seletivo da COX-2 pode diminuir ou não ter efeito sobre as convulsões induzidas por metilmalonato, dependendo da dose do medicamento administrada. A administração de uma dose baixa do inibidor da COX-2 (0,2 mg/kg celecoxibe) não inibiu as convulsões, provavelmente devido à insuficiência de diminuição da produção de PGE_2 (Baik, 1999; Gobbo, 2004).

Quando a dose de celecoxibe, foi aumentada para 2 mg/kg, um efeito protetor pleno do inibidor da COX-2 contra as convulsões induzidas por MMA foi encontrado (Figura 4). No entanto, um aumento maior na dose de celecoxibe para 20 mg/kg resultou em uma falta de efeito anticonvulsivante, reproduzindo, em certa medida, o efeito bifásico, previamente relatado para o celecoxibe contra convulsões induzidas por PTZ (Oliveira, 2008). O efeito bifásico de celecoxibe pode ser explicado por uma falta de seletividade de altas doses do composto, que apresenta uma relação de seletividade (IC_{50} COX-2/ IC_{50} COX-1) de 7,6. Assim, uma vez que o celecoxibe na dose de 2 mg/kg, inibe plenamente a COX-2 no cérebro (Ciceri, 2002), é razoável que uma dose 10 vezes maior (20 mg/kg) careceria seletividade e inibiria também a COX-1. Sabe-se que inibidores seletivos e não-seletivos da COX-1 aumentam as

convulsões (Akarsu, 2006; Sanchez-Hernandez, 1999). Portanto, é possível que a falta de seletividade para COX-2 da dose de celecoxibe de 20 mg/kg tenha resultado em falta de atividade anticonvulsivante deste composto contra as convulsões induzidas por MMA. Tem sido descrito que as duas isoenzimas da COX são diferentemente acopladas com prostaglandina sintases específicas (Ueno, 2001; Ueno, et al., 2005), sendo a PGE₂ preferencialmente produzida pela COX-2, e a PGD₂ pela COX-1. Portanto, a inibição da COX-2 pelo celecoxibe resultasse na diminuição dos níveis de PGE₂, diminuindo a suscetibilidade ao MMA, como descrito anteriormente para PTZ (Oliveira, 2008).

Em resumo, neste estudo demonstramos que a PGE₂ agrava e o celecoxibe inibe as crises convulsivas induzidas por MMA. Estes resultados indicam um papel para os eicosanóides, particularmente para a PGE₂, nas convulsões induzidas por este ácido orgânico, e está em pleno acordo com a perspectiva de que infecções precipitam e agravam crises metabólicas e disfunção neurológica em pacientes com acidemia metilmalônica. Eles também indicam que a terapia adjuvante com drogas anti-inflamatórias, especialmente inibidores seletivos da COX-2, pode ser de valor na clínica, como foi demonstrado em outras doenças neurológicas em que as convulsões estão associados a um aumento da resposta inflamatória (Singh, 2008).

Embora pacientes com acidemia metilmalônica apresentem alterações comportamentais e bioquímicas, tais como convulsões (Fenton e Rosenberg, 1995) compatíveis com o presente modelo experimental, é difícil extrapolar resultados obtidos com animais para o ser humano. Contudo, o papel da PGE₂ nas convulsões induzidas pelo MMA, evidenciado no presente estudo, pode ser de grande valia para o entendimento da fisiopatologia desta doença bem como no estabelecimento novas condutas para tratamento dos pacientes com acidemia metilmalônica.

Outros estudos em seres humanos são necessários para avaliar as implicações clínicas dos nossos achados. Dada a ampla utilização de anti-inflamatórios para o tratamento da dor e de respostas inflamatórias em geral, e à elevada prevalência de epilepsia, poderia-se considerar os inibidores seletivos da COX-2 mais seguros do que os inibidores inespecíficos para o tratamento da dor em pacientes epiléticos. Contudo, uma vez que inibidores seletivos da COX-2 podem favorecer ou reduzir as convulsões, dependendo do modelo experimental utilizado, mais estudos são necessários para determinar os tipos específicos de

crises em que a prescrição de um inibidor seletivo da COX-2 poderia ser uma medida terapêutica mais segura para o tratamento da dor neste grupo de pacientes.

6.CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

1. A injeção intracerebroventricular de PGE₂ (100 ng/ 2 µL) potencializa as convulsões induzidas pela injeção de MMA (2,5 µmol/ 2 µL, i.c.v.) em ratos.

2. O pré-tratamento com o inibidor seletivo da ciclooxigenase-2, celecoxibe, na dose de 2 mg/kg por via oral (mas não nas doses de 0,2 e 20 mg/kg), protege contra as convulsões induzidas por MMA (2,5 µmol/ 2 µL, i.c.v.).

3. O efeito anticonvulsivante do inibidor seletivo da ciclooxigenase-2, celecoxibe (2 mg/kg v.o) foi revertido com a administração intracerebroventricular de PGE₂ (100ng/2µL).

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abul Abbas et al. **Robbins Patologia Básica**. Elsevier, 8ª Ed. 2008.

Akarsu ES, Mamuk S, Comert A. Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. **Epilepsy Research**; v. 30 n. (1): p. 63-68, 1998.

Akarsu ES, et al. The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction. **Epilepsy Research**; v. 71 n. (2-3): p. 181-187, 2006.

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 n. (1): p. 438-445, 1997.

Akiba S, Sato T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**; v. 27 n. (8): p. 1174-1178, 2004.

Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylentetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. **Epilepsy Research**; v. 78 n. (1): p. 60-70, 2008.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Review Neuroscience**; v. 2 n. (10): p. 734-744, 2001.

Anderson GD, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**; v. 97 n. (11): p. 2672-2679, 1996.

Ando T, et al. Propionic acidemia in patients with ketotic hyperglycinemia. **The Journal of Pediatrics**; v. 78 n. (5): p. 827-832, 1971.

Armstrong DL. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. **Trends in Neuroscience**; v. 12 n. (3): p. 117-122, 1989.

Armstrong RA, Marr C, Jones RL. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. **Prostaglandins**; v. 49 n. (4): p. 205-224, 1995.

Aronoff DM, Neilson EG. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **The American Journal of Medicine**; v. 111 n. (4): p. 304-315, 2001.

Baik EJ, et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. **Brain Research**; v. 843 n. (1-2): p. 118-129, 1999.

Balosso S, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Annals of Neurology**; v. 57 n. (6): p. 804-812, 2005.

Baran H, Heldt R, Hertting G. Increased prostaglandin formation in rat brain following systemic application of kainic acid. **Brain Research**; v. 404 n. (1-2): p. 107-112, 1987.

Barriviera ML, et al. Denervation alters protein-lipid interactions in membrane fractions from electrocytes of *Electrophorus electricus* (L.). **Biophysical Chemistry**; v. 91 n. (1): p. 93-104, 2001.

Bazan NG, et al. The accumulation of free arachidonic acid, diacylglycerols, prostaglandins, and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. **Advances in Neurology**; v. 44 n.: p. 879-902, 1986.

Bazan NG, Jr. Changes in free fatty acids of brain by drug-induced convulsions, electroshock and anaesthesia. **Journal of Neurochemistry**; v. 18 n. (8): p. 1379-1385, 1971.

Beal MF, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. **J Neurosci**; v. 13 n. (10): p. 4181-4192, 1993.

Beckman, J.S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster J, ed. **Nitric oxide principles and actions**. San Diego: Academic Press, v. 7, 1996.

Behrens MI, et al. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. **Neuroreport**; v. 6 n. (3): p. 545-548, 1995.

Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**; v. 14 n. (2): p. 375-403, 1985.

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

Beutler, B., Beutler, S. M., The pathogenesis of fever. In: WYNGAARDEN J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. (Eds). **Cecil Textbook of Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992. p. 1568-1573.

Bezzi P, et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature**; v. 391 n. (6664): p. 281-285, 1998.

Birkle DL, Bazan NG. Effect of bicuculline-induced status epilepticus on prostaglandins and hydroxyeicosatetraenoic acids in rat brain subcellular fractions. **Journal of Neurochemistry**; v. 48 n. (6): p. 1768-1778, 1987.

Blatteis CM, et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**; v. 76 n. (1-4): p. 1-18, 2005.

Blatteis CM. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**; v. 111 n. (1): p. 194-223, 2006.

Blatteis, C.M., The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy., **Journal of Thermal Biology**, 29:359-368, 2004.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**; v. 361 n. (6407): p. 31-39, 1993.

Boie Y, et al. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**; v. 340 n. (2-3): p. 227-241, 1997.

Bosetti F, Langenbach R, Weerasinghe GR. 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. **Journal of Neurochemistry**; v. 91 n. (6): p. 1389-1397, 2004.

Bough KJ, Mott DD, Dingledine RJ. Medial perforant path inhibition mediated by mGluR7 is reduced after status epilepticus. **Journal of Neurophysiology**; v. 92 n. (3): p. 1549-1557, 2004.

Boulant JA. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Disease: an official publication of the Infectious Disease Society of America**; v. 31 Suppl 5 n.: p. S157-161, 2000.

Breyer MD, Breyer RM. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. **Annual Review Physiology**; v. 63 n.: p. 579-605, 2001.

Brorson JR, Marcuccilli CJ, Miller RJ. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. **Stroke: a Journal of Cerebral Circulation**; v. 26 n. (7): p. 1259-1266; discussion 1267, 1995.

Brouillet E, et al. Aminooxyacetic acid striatal lesions attenuated by 1,3-butanediol and coenzyme Q10. **Neuroscience Letters**; v. 177 n. (1-2): p. 58-62, 1994.

Buchhalter JR. Animal models of inherited epilepsy. **Epilepsia**; v. 34 Suppl 3 n.: p. S31-41, 1993.

Burns SP, et al. Propionylcarnitine excretion is not affected by metronidazole administration to patients with disorders of propionate metabolism. **European Journal of Pediatrics**; v. 155 n. (1): p. 31-35, 1996.

Campbell IL, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 90 n. (21): p. 10061-10065, 1993.

Cao C, et al. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. **Brain Research**; v. 697 n. (1-2): p. 187-196, 1995.

Cardinale GJ, Carty TJ, Abeles RH. Effect of methylmalonyl coenzyme A, a metabolite which accumulates in vitamin B 12 deficiency, on fatty acid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 245 n. (15): p. 3771-3775, 1970.

Chan PH, et al. Effects of excitatory neurotransmitter amino acids on swelling of rat brain cortical slices. **Journal of Neurochemistry**; v. 33 n. (6): p. 1309-1315, 1979.

Chandrasekharan NV, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 99 n. (21): p. 13926-13931, 2002.

Cheema-Dhadli S, Leznoff CC, Halperin ML. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. **Pediatrics Research**; v. 9 n. (12): p. 905-908, 1975.

Chen C, Bazan NG. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Journal of Neurophysiology**; v. 93 n. (2): p. 929-941, 2005.

Ciceri P, et al. Pharmacology of celecoxib in rat brain after kainate administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**; v. 302 n. (3): p. 846-852, 2002.

Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**; v. 210 n. (2): p. 93-101, 1995.

Claveau D, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production in the rat adjuvant-induced arthritis model. **The Journal of Immunology**; v. 170 n. (9): p. 4738-4744, 2003.

Clements MP, Bliss TV, Lynch MA. Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus. **Neuroscience**; v. 45 n. (2): p. 379-389, 1991.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**; v. 46 n. (2): p. 205-229, 1994.

Cornejo V, et al. [Phenylketonuria diagnosed during the neonatal period and breast feeding]. **Revista Medica de Chile**; v. 131 n. (11): p. 1280-1287, 2003.

Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. **The Journal of Clinical Investigation**; v. 64 n. (6): p. 1544-1551, 1979.

Crofford LJ, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **The Journal of Clinical Investigation**; v. 93 n. (3): p. 1095-1101, 1994.

Davies NM, et al. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**; v. 7 n. (2): p. 217-226, 2004.

De Luca, G., et al. Amino acid levels in some lethargic mouse brain areas before and after pentylenetetrazole kindling. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 81: p. 47-53, 2005.

De Luca, G., et al. Amino acid levels in some brain areas of inducible nitric oxide synthase knock out mouse (iNOS_{-/-}) before and after pentylenetetrazole kindling. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**; v. 85: p. 804-812, 2006.

de Mello CF, et al. Effects of methylmalonate and propionate on [3H]glutamate binding, adenylate cyclase activity and lipid synthesis in rat cerebral cortex. **Biochemistry and Molecular Biology International**; v. 42 n. (6): p. 1143-1150, 1997.

de Mello CF, et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research**; v. 721 n. (1-2): p. 120-125, 1996.

De Sarro, G., Gareri, P., Falconi, U., de Sarro, A. 7-Nitroindazole potentiates the antiseizure activity of some anticonvulsants in DBA/2 mice. **European Journal of Pharmacological**. v. 394: p. 275-288. 1996

Desjardins P, et al. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. **Neurochemistry International**; v. 42 n. (4): p. 299-303, 2003.

Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action.

Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry; v. 30 n. (8): p. 1478-1485, 2006.

Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in various animal models (bicuculline, picrotoxin, maximal electroshock-induced convulsions) of epilepsy with possible mechanism of action. **Indian Journal of Experimental Biology**; v. 44 n. (4): p. 286-291, 2006.

Dichter MA. Innovative clinical trial designs for future antiepileptic drugs. **Epilepsia**; v. 48 Suppl 1 n.: p. 26-30, 2007.

Dubois RN, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**; v. 12 n. (12): p. 1063-1073, 1998.

Dumuis A, et al. Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors. **Nature**; v. 347 n. (6289): p. 182-184, 1990.

Dumuis A, et al. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. **Nature**; v. 336 n. (6194): p. 68-70, 1988.

Dutra JC, et al. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 16 n. (1): p. 147-153, 1993.

Dutra, J.C. **Efeito do metilmalonato e do propionato sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo intermediário cerebral de ratos jovens**. 1992. 192f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná em convênio com o Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curitiba, 1992.

Elmqvist JK, et al. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **The Journal of Comparative Neurology**; v. 371 n. (1): p. 85-103, 1996.

Engel J, Jr. Classification of epileptic disorders. **Epilepsia**; v. 42 n. (3): p. 316, 2001.

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.

Fiebich BL, et al. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. **Journal of Neurochemistry**; v. 68 n. (2): p. 704-709, 1997.

Fighera MR, et al. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport**; v. 10 n. (10): p. 2039-2043, 1999.

Fighera MR, et al. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; v. 35 n. (4): p. 465-473, 2003.

FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nature Reviews Drug Discovery**; v. 2 n. (11): p. 879-890, 2003.

Fontella FU, et al. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neuroreport**; v. 11 n. (3): p. 541-544, 2000.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **The Faseb Journal: official publication of the Federation of American Societes for Experimental Biology**; v. 12 n. (10): p. 773-790, 1998.

Frankel DL, Wells H, Fillios LC. Concentrations of asparagine in tissues of prepubertal rats after enzymic or dietary depletion of asparagine. **The Biochemical Journal**; v. 132 n. (3): p. 645-648, 1973.

Fredstrom S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. **Nutrition**; v. 18 n. (6): p. 537-539, 2002.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**; v. 294 n. (5548): p. 1871-1875, 2001.

Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 89 n. (22): p. 10945-10949, 1992.

Gemba T, Oshima T, Ninomiya M. Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. **Neuroscience**; v. 63 n. (3): p. 789-795, 1994.

Givalois L, et al. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. **The American Journal of Physiology**; v. 267 n. (1 Pt 2): p. R164-170, 1994.

Glasgow AM, Chase HP. Effect of pent-4-enoic acid, propionic acid and other short-chain fatty acids on citrulline synthesis in rat liver mitochondria. **The Biochemical Journal**; v. 156 n. (2): p. 301-307, 1976.

Gobbo OL, O'Mara SM. Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. **Neuroscience**; v. 125 n. (2): p. 317-327, 2004.

Goldblatt MW. Properties of human seminal plasma. **The Journal of Physiology**; v. 84 n. (2): p. 208-218, 1935.

Guix FX, et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**; v. 76 n. (2): p. 126-152, 2005.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nature Review Cancer**; v. 1 n. (1): p. 11-21, 2001.

Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. **Mediators of Inflammation**; v. 4 n. (1): p. 5-15, 1995.

Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. **The Journal Clinical Investigation**; v. 50 n. (11): p. 2276-2282, 1971.

Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & Therapeutics**; v. 103 n. (2): p. 147-166, 2004.

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. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**; v. 137 n. (3): p. 329-334, 1982.

Hemler M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 251 n. (18): p. 5575-5579, 1976.

Hillman RE, Otto EF. Inhibition of glycine-serine interconversion in cultured human fibroblasts by products of isoleucine catabolism. **Pediatrics Research**; v. 8 n. (12): p. 941-945, 1974.

Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 93 n. (10): p. 4885-4890, 1996.

Hoffmann C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. **Current Medicinal Chemistry**; v. 7 n. (11): p. 1113-1120, 2000

Hoffmann GF, et al. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 16 n. (4): p. 648-669, 1993.

Holtmann L, et al. Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**; v. 84: p. 56 -66, 2009.

Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**; v. 9 n.: p. 1977-1993, 2004.

Jorgensen PL, Collins JH. Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of alpha-subunit of (Na⁺ K⁺)-ATPase from outer medulla of mammalian kidney. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 860 n. (3): p. 570-576, 1986.

Jung KH, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**; v. 23 n. (2): p. 237-246, 2006.

Kajiwara K, et al. Molecular characterization of seizure-related genes isolated by differential screening. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; v. 219 n. (3): p. 795-799, 1996.

Kamei D, et al. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 279 n. (32): p. 33684-33695, 2004.

Kang DG, Kim JW, Lee J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na⁺,K⁺ ATPase activity in the kidney. **Pharmacological Research**; v. 41 n. (1): p. 123-127, 2000.

Kaufmann WE, et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 93 n. (6): p. 2317-2321, 1996.

Kelley KA, et al. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. **The American Journal of Pathology**; v. 155 n. (3): p. 995-1004, 1999.

Kim J, Alger BE. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. **Nature Neuroscience**; v. 7 n. (7): p. 697-698, 2004.

Kingston WP, Greaves MW. Actions of prostaglandin E2 metabolites on skin microcirculation. **Agents and Actions**; v. 16 n. (1-2): p. 13-14, 1985.

Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**; v. 315 n. (1): p. 1-7, 2005.

Kojima F, et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**; v. 6 n. (4): p. R355-365, 2004.

Kowaltowski AJ, et al. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. **Experimental Neurology**; v. 201 n. (1): p. 165-171, 2006.

Kunz T, Oliw EH. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. **The European Journal of Neuroscience**; v. 13 n. (3): p. 569-575, 2001.

Kuo HP, Liu S, Barnes PJ. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. **European Journal of Pharmacology**; v. 221 n. (2-3): p. 385-388, 1992.

Kurumbail RG, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**; v. 384 n. (6610): p. 644-648, 1996.

Lee SC, et al. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. **Journal of Neuroimmunology**; v. 46 n. (1-2): p. 19-24, 1993.

Leonard JV, Walter JH, McKiernan PJ. The management of organic acidaemias: the role of transplantation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 24 n. (2): p. 309-311, 2001.

Ludolph AC, et al. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**; v. 18 n. (4): p. 492-498, 1991.

Machwate M, et al. Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2). **Molecular Pharmacology**; v. 60 n. (1): p. 36-41, 2001.

Madl JE, Burgesser K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. **Journal of Neuroscience**; v. 13 n. (10): p. 4429-4444, 1993.

Madrigal JL, et al. Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability. **Antioxidants & Redox Signaling**; v. 8 n. (5-6): p. 885-892, 2006.

Malfatti CR, 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 n. (6): p. 761-767, 2003.

Marcheselli VL, Bazan NG. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor

antagonist. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 271 n. (40): p. 24794-24799, 1996.

Marsden PA, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 268 n. (23): p. 17478-17488, 1993.

McDonald JW, Schoepp DD. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Research**; v. 624 n. (1-2): p. 239-244, 1993.

Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nature Review Drug Discovery**; v. 5 n. (1): p. 75-86, 2006.

Miyamoto T, et al. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 251 n. (9): p. 2629-2636, 1976.

Morath MA, et al. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria--a pathophysiological approach. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 31 n. (1): p. 35-43, 2008.

Naffah-Mazzacoratti MG, Bellissimo MI, Cavalheiro EA. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**; v. 27 n. (6): p. 461-466, 1995.

Nakamura K, et al. Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. **Neuroscience Letter**; v. 260 n. (2): p. 117-120, 1999.

Nakamura K, et al. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**; v. 421 n. (4): p. 543-569, 2000.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**; v. 79 n. (4): p. 1193-1226, 1999.

Nathanson JA, et al. 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 n. (4): p. 781-794, 1995.

Needleman P, et al. Arachidonic acid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**; v. 55 n.: p. 69-102, 1986.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostaglandin E receptors. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**; v. 12 n. (2-3): p. 379-391, 1995.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nature Reviews**; v. 3 n. (3): p. 216-227, 2002.

Obrenovitch TP, et al. Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. **International Journal of Developmental Neuroscience**; v. 18 n. (2-3): p. 281-287, 2000.

Ogier, H.; Charpentier C.; Saudubray, J. H. **Inborn Metabolic Diseases. Organic acidemias** Fernandes, J., Sudubray, J. M. and Tada, K. (Eds) 1th. Edition, Berlim, Springer-Verlag, 271-299, 1990.

Okada K, et al. Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. **Brain Research**; v. 894 n. (2): p. 332-335, 2001.

Oliveira MS, et al. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Research**; v. 79 n. (1): p. 14-21, 2008.

Oliveira MS, et al. Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neuroscience**; v. 152 n. (4): p. 1110-1118, 2008.

Oliveira MS, et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **Journal of Neurochemistry**; v. 109 n. (2): p. 416-426, 2009.

Patel MS, Owen OE. Effect of hyperphenylalaninaemia on lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. **The Biochemical Journal**; v. 154 n. (2): p. 319-325, 1976.

Pavlovic G, Eyer CL, Isom GE. Neuroprotective effects of PKC inhibition against chemical hypoxia. **Brain Research**; v. 676 n. (1): p. 205-211, 1995.

Pellerin L, Wolfe LS. Release of arachidonic acid by NMDA-receptor activation in the rat hippocampus. **Neurochemical Research**; v. 16 n. (9): p. 983-989, 1991.

Piomelli D. Eicosanoids in synaptic transmission. **Critical Reviews in Neurobiology**; v. 8 n. (1-2): p. 65-83, 1994.

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

Rall JM, Mach SA, Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. **Brain Research**; v. 968 n. (2): p. 273-276, 2003.

Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**; v. 3 n. (7): p. 569-581, 2003.

Ravizza T, et al. Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. **Neurobiology of Disease**; v. 31 n. (3): p. 327-333, 2008.

Ribeiro LR, et al. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**; v. 27 n. (2): p. 157-163, 2009.

Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**; v. 17 n. (1): p. 13-19, 2003.

Rome LH, Lands WE. Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 72 n. (12): p. 4863-4865, 1975.

Ross R, et al. Involvement of NO in contact hypersensitivity. **International Immunology**; v. 10 n. (1): p. 61-69, 1998.

Rothman SM. Excitotoxins: possible mechanisms of action. **Annals of the New York Academy of Sciences**; v. 648 n.: p. 132-139, 1992.

Royes LF, et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**; v. 118 n. (4): p. 1079-1090, 2003.

Royes LF, et al. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**; v. 83 n. (1): p. 136-144, 2006.

Royes LF, et al. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience Letters**; v. 376 n. (2): p. 116-120, 2005.

Royes LF, et al. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. **Epilepsy Research**; v. 73 n. (3): p. 228-237, 2007.

Sanchez-Hernandez MC, et al. Seizures induced by NSAID. **Allergy**; v. 54 n. (1): p. 90-91, 1999.

Sang N, Chen C. Lipid signaling and synaptic plasticity. **Neuroscientist**; v. 12 n. (5): p. 425-434, 2006.

Sang N, et al. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. **The Journal of Neuroscience**; v. 25 n. (43): p. 9858-9870, 2005.

Sayyah M, et al. Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats. **Experimental Neurology**; v. 191 n. (1): p. 145-153, 2005.

Schacher S, Kandel ER, Montarolo P. cAMP and arachidonic acid simulate long-term structural and functional changes produced by neurotransmitters in Aplysia sensory neurons. **Neuron**; v. 10 n. (6): p. 1079-1088, 1993.

Schmidt HH, et al. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**; v. 40 n. (10): p. 1439-1456, 1992.

Seregi A, et al. Studies on prostaglandin F2 alpha formation caused by pentametylenetetrazol-induced convulsions in rat brain. **Prostaglandins**; v. 21 n. (2): p. 217-226, 1981.

Siesjo BK. Measurements of cerebral oxygen consumption: advantages and limitations. **European Neurology**; v. 20 n. (3): p. 194-199, 1981.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**; v. 56 n. (3): p. 387-437, 2004.

Singh G, Prabhakar S. The effects of antimicrobial and antiepileptic treatment on the outcome of epilepsy associated with central nervous system (CNS) infections. **Epilepsia**; v. 49 Suppl 6 n.: p. 42-46, 2008.

Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. **Neuropharmacology**; v. 49 n. (5): p. 660-668, 2005.

Slanina KA, Schweitzer P. Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. **Neuropharmacology**; v. 49 n. (5): p. 653-659, 2005.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**; v. 69 n.: p. 145-182, 2000.

Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Advances in Immunology**; v. 62 n.: p. 167-215, 1996.

Smith WL, Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. **Biochemistry**; v. 11 n. (17): p. 3276-3285, 1972.

Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 1083 n. (1): p. 1-17, 1991.

Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**; v. 266 n. (5): p. 68-71, 74-67, 1992.

Snyder SH, Sabatini DM. Immunophilins and the nervous system. **Nature Medicine**; v. 1 n. (1): p. 32-37, 1995.

Stellwagen D, et al. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Neuroscience**; v. 25 n. (12): p. 3219-3228, 2005.

Stewart PM, 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. **The Journal of Clinical Investigation**; v. 66 n. (3): p. 484-492, 1980.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. **Journal of Neural Transmission**; v. 59 n.: p. 81-89, 2000.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 282 n. (16): p. 11613-11617, 2007.

Swanson RA, Farrell K, Simon RP. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**; v. 15 n. (3): p. 417-424, 1995.

Takemiya T, et al. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**; v. 71 n. (3-4): p. 205-216, 2003.

Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. **Learning & Memory**; v. 9 n. (1): p. 41-47, 2002.

Tocco G, et al. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**; v. 144 n. (2): p. 339-349, 1997.

Tomimoto H, et al. Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans. **Acta Neuropathologica**; v. 99 n. (1): p. 26-30, 2000.

Touati G, et al. Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 29 n. (2-3): p. 288-298, 2006.

Toyoshima S, et al. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. **The Journal of Nutrition**; v. 125 n. (11): p. 2846-2850, 1995.

Treacy E, et al. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. **The Journal of Pediatrics**; v. 129 n. (3): p. 445-448, 1996.

Ueno N, et al. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 276 n. (37): p. 34918-34927, 2001.

Ueno N, et al. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; v. 338 n. (1): p. 70-76, 2005.

Umemura A, Mabe H, Nagai H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. **Stroke: a Journal of Cerebral Circulation**; v. 23 n. (8): p. 1163-1166, 1992.

Ushikubi F, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**; v. 395 n. (6699): p. 281-284, 1998.

Utter ME, Fung CH. Possible control mechanisms of liver pyruvate carboxylase. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiologische Chemie**; v. 351 n. (3): p. 284-285, 1970.

van der Meer SB, et al. Clinical outcome of long-term management of patients with vitamin B12-unresponsive methylmalonic acidemia. **The Journal of Pediatrics**; v. 125 n. (6 Pt 1): p. 903-908, 1994.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**; v. 38 n.: p. 97-120, 1998.

Vane JR, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 91 n. (6): p. 2046-2050, 1994.

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain, Behavior, and Immunity**; v. 22 n. (6): p. 797-803, 2008.

Vezzani A, et al. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 97 n. (21): p. 11534-11539, 2000.

Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**; v. 46 n. (11): p. 1724-1743, 2005.

Vidensky S, et al. Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response. **Neuromolecular Medicine**; v. 3 n. (1): p. 15-28, 2003.

Visioli F, et al. Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. **Metabolic Brain Disease**; v. 9 n. (2): p. 161-170, 1994.

Viviani B, et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **Journal of Neuroscience**; v. 23 n. (25): p. 8692-8700, 2003.

Volterra A. Arachidonic acid metabolites as mediators of synaptic modulation. **Cell Biogyl International Reports**; v. 13 n. (12): p. 1189-1199, 1989.

von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). **The Journal of Physiology**; v. 88 n. (2): p. 213-234, 1936.

Wajner M, et al. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**; v. 15 n. (1): p. 92-96, 1992.

Wang S, et al. Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**; v. 292 n. (2): p. 497-504, 2000.

Warner TD, et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro

analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 96 n. (13): p. 7563-7568, 1999.

Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**; v. 18 n. (7): p. 790-804, 2004.

Williams JA, Shacter E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 272 n. (41): p. 25693-25699, 1997.

Williams KI, Higgs GA. Eicosanoids and inflammation. **The Journal of Pathology**; v. 156 n. (2): p. 101-110, 1988.

Woo SK, et al. Gastric mucosal binding studies with enprostil: a potent anti-ulcer prostaglandin. **Prostaglandins**; v. 32 n. (2): p. 243-257, 1986.

Wyse AT, et al. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport**; v. 11 n. (10): p. 2331-2334, 2000.

Yamagata K, et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**; v. 11 n. (2): p. 371-386, 1993.

Yedgar S, Lichtenberg D, Schnitzer E. Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 1488 n. (1-2): p. 182-187, 2000.

Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ. NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons in vitro caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. **Journal of Neurochemistry**; v. 64 n. (1): p. 455-458, 1995.

Zhang HJ, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor inhibits hippocampal synaptic reorganization in pilocarpine-induced status epilepticus rats. **Journal of Zhejiang University Science**; v. 9 n. (11): p. 903-915, 2008.