

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**O PAPEL DA CICLOOXIGENASE-2 E DA  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NAS CONVULSÕES INDUZIDAS  
POR PENTILENOTETRAZOL**

---

**MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Porto Alegre, RS, Brasil

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**O PAPEL DA CICLOOXIGENASE-2 E DA  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NAS CONVULSÕES INDUZIDAS  
POR PENTILENOTETRAZOL**

---

**MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Dissertação apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, RS, Brasil

2007

*“O saber é saber que nada se sabe. Este é a definição  
do verdadeiro conhecimento”.*

*Confúcio (551 - 479 a.c.), filósofo chinês*

*Essa dissertação é dedicada aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Ney, que sempre fizeram de seus filhos a maior prioridade de suas vidas.

Ao professor e amigo Carlos Mello, muito obrigado pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação e amizade.

Ana Flávia... minha amiga, namorada, colega, noiva (não necessariamente nesta mesma ordem)... muito obrigado pelo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo.

Aos amigos e colegas Nando, Michele e Natasha, que deram um significado especial para palavra grupo. Sem vocês não conseguiria realizar este trabalho. Muito obrigado.

Ao professor Juliano Ferreira, muito obrigado pela amizade e pelas importantes sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus amigos e colegas de laboratório, muito obrigado pelas discussões científicas (e também por aquelas nem tão científicas assim, mas obviamente divertidíssimas) e pelos momentos de descontração que sem dúvida foram importantíssimos para a realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pela oportunidade de participar de seu corpo docente.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

### Capítulo I

Resumo.....	2
Abstract.....	3
Lista de abreviaturas.....	4
1. Introdução.....	6
1.1. Prostaglandinas e ciclooxigenases.....	7
1.2. COX-2 e prostaglandinas no cérebro.....	13
1.3. Papel fisiológico da COX-2 e da PGE <sub>2</sub> no cérebro.....	14
1.3.1. Ciclo sono/vigília.....	15
1.3.2. Termoregulação e febre.....	16
1.3.3. Aprendizado e memória.....	16
1.4. Papel patológico da COX-2 e da PGE <sub>2</sub> no cérebro.....	17
1.4.1. Isquemia.....	17
1.4.2. Trauma crânio-encefálico.....	18
1.4.3. Convulsões e epilepsia.....	19
1.5. Carbonilação de proteínas.....	21
1.6. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	22
2. Objetivo.....	24
2.1 Hipóteses.....	25
Capítulo II	
3. Artigo científico.....	27

### Capítulo III

4. Discussão.....	66
5. Conclusões.....	72
6. Referências.....	74
7. Anexos.....	87
7.1. Lista de figuras.....	88
7.2. Lista de tabelas.....	90
7.3. Trabalhos desenvolvidos no período não relacionados a presente dissertação de mestrado.....	91

## CAPÍTULO I



## RESUMO

Ciclooxigenase (COX) é a enzima marca-passo na rota metabólica onde o ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas. COX-2 é a isoforma que é induzida em sítios de lesão/inflamação e expressa constitutivamente em alguns poucos tecidos, como o sistema nervoso central. Tem sido sugerido que a COX-2 tem um papel importante em várias doenças neurodegenerativas, incluindo epilepsia. Neste estudo nós testamos se o celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2 (0,2; 2 ou 20 mg/kg, p.o.) protege contra as convulsões, carbonilação de proteínas e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), um agente convulsivante clássico que tem sido largamente usado para estudo da epilepsia e na busca de novos compostos com atividade anticonvulsivante. A administração de celecoxib (2 mg/kg) atenuou as convulsões comportamentais e eletrográficas e a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ no hipocampo e córtex cerebral de ratos, sugerindo um papel facilitatório para COX-2 nos efeitos do PTZ. Já que existem evidências que a PGE<sub>2</sub> é um mediador chave na via de sinalização da COX-2, nós decidimos investigar o efeito da administração intracerebroventricular de anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> (4 µg/2 µl, i.c.v.) sobre os episódios convulsivos e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ. A administração de anticorpos anti- PGE<sub>2</sub> atenuou as convulsões comportamentais e eletrográficas e a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ no hipocampo e córtex cerebral de ratos. Em outro experimento, nós mostramos que a administração intracerebroventricular de PGE<sub>2</sub> (100 ng/2 µl, i.c.v.) não causou convulsões *per se*, mas induziu o aparecimento de convulsões eletrográficas em combinação com uma dose subconvulsivante de PTZ (20 mg/kg, i.p.), reforçando um importante papel para PGE<sub>2</sub> nas convulsões induzidas por PTZ. Em conjunto estes dados suportam um papel facilitatório para a via COX-2/PGE<sub>2</sub> nas convulsões e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ.

## ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme in the metabolic pathway where arachidonic acid is converted to prostaglandins. COX-2 is the isoform of cyclooxygenase which is inducible at injury/inflammation sites and expressed constitutively in a few tissues, such as the central nervous system. It has been suggested that COX-2 plays a role in several disorders, including convulsive behavior. In this study we tested whether celecoxib, a selective COX-2 inhibitor (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) protects against the convulsions, protein carbonylation and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by pentylenetetrazol (PTZ; 60 mg/kg, i.p.), a classical convulsant agent that has been fairly used for the study of epilepsy and screening of new compounds with antiepileptic activity. The systemic administration of celecoxib (2 mg/kg) attenuated PTZ-induced behavioral and electroencephalographic seizures and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex of rats, suggesting a facilitatory role for COX-2 on the PTZ-induced effects. Since there is a bulk of evidence showing that PGE<sub>2</sub> is a key mediator in COX-2 signaling, we decided to investigate the effect of the intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> antibodies (4 μg/2 μl, i.c.v.) on the convulsive episodes and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by PTZ. Administration of anti-PGE<sub>2</sub> antibodies attenuated PTZ-induced behavioral and electroencephalographic seizures and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex of rats. In a reverse approach, we showed that intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> (100 ng/2 μl, i.c.v.) did not cause electrographic alterations *per se*, but elicits electroencephalographic convulsions if given in combination with a subconvulsant dose of PTZ (20 mg/kg, i.p.), further suggesting an important role for this prostaglandin in the convulsant effects of PTZ. Collectively, these data support a facilitatory role for the COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway in PTZ-induced convulsions and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC - adenilato ciclase

AMPC – monofosfato de adenosina cíclico

ATP - adenosina trifosfato

COX-1 - ciclooxigenase 1

COX-2 - ciclooxigenase 2

COX-3 - ciclooxigenase 3

DNPH - dinitrofenil-hidrazina

EP<sub>1</sub> - receptor para prostaglandina E<sub>2</sub>, tipo 1

EP<sub>2</sub> - receptor para prostaglandina E<sub>2</sub>, tipo 2

EP<sub>3</sub> - receptor para prostaglandina E<sub>2</sub>, tipo 3

EP<sub>4</sub> - receptor para prostaglandina E<sub>2</sub>, tipo 4

i.c.v.- intracerebroventricular

i.p. - intraperitoneal

MN - membrana nuclear

MP - membrana plasmática

MRE - membrana de retículo endoplasmático

NMDA - N-metil-D-aspartato

NSAIDS - antiinflamatórios não-esteroidais

PBS - Solução salina (NaCl 0,9 %) tamponada com fosfato

PGD<sub>2</sub> - prostaglandina D<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2α</sub> - prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGG<sub>2</sub> - prostaglandina G<sub>2</sub>

PGH<sub>2</sub> - prostaglandina H<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> - prostaglandina I<sub>2</sub>

PKC - proteína quinase C

PLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub>

PLC - fosfolipase C

p.o. - via oral

PTZ - pentilenotetrazol

SDS - dodecil sulfato de sódio

TXA<sub>2</sub> - tromboxano A<sub>2</sub>

---

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

### 1.1. Prostaglandinas e ciclooxigenases

A história da descoberta das prostaglandinas e da ciclooxigenase começa em 1930, quando Kurzrok e Lieb, dois ginecologistas americanos, observaram que fatias de musculatura uterina podiam se contrair ou relaxar em contato com sêmen (Kurzrok and Lieb, 1930). Alguns anos mais tarde, o sueco von Euler e o inglês Goldblatt mostraram de maneira independente que a substância presente no sêmen também possuía atividade contracturante da musculatura lisa de outros órgãos e também possuía ação hipotensora (Goldblatt, 1935; von Euler, 1936). Von Euler identificou o composto ativo como uma substância lipídica ácida solúvel, a qual ele chamou de prostaglandina (von Euler, 1936). Na década de 1960 descobriu-se 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  $E_1$  e da prostaglandina  $F_{1\alpha}$  (Bergstrom and Samuelsson, 1962).

A família dos eicosanóides inclui as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e algumas outras substâncias estruturalmente relacionadas. O termo eicosanóide vem do fato de que estas substâncias são derivadas de ácidos graxos essenciais poliinsaturados com 20 carbonos (do grego *eikos* = vinte), como por exemplo, o ácido araquidônico [20:4(5,8,11,14)]. O ácido araquidônico é o principal precursor da formação de eicosanóides e encontra-se esterificado com glicerofosfolipídios de membrana (Bergstrom et al., 1964). Por ação de acil-hidrolases, particularmente da fosfolipase  $A_2$ , o ácido araquidônico é liberado das membranas e serve como substrato para

ciclooxigenases, lipoxigenases ou enzimas do sistema do citocromo P450 para formação de eicosanóides (Simmons et al., 2004).

A cicloxigenase (COX) (E.C. 1.14.99.1), também chamada de prostaglandina H<sub>2</sub> sintase (PGHS), foi identificada como a principal enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em PGH<sub>2</sub> em 1972 (Smith and Lands, 1972), e purificada em 1976 a partir de vesículas seminais de ovelha (Hemler and Lands, 1976; Miyamoto et al., 1976). Embora a velocidade de síntese de PGH<sub>2</sub> 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 cicloxigenase é uma enzima bifuncional que possui duas atividades enzimáticas que ocorrem em dois sítios catalíticos distintos (Vane et al., 1998; Simmons et al., 2004):

a) Atividade de ciclooxigenase: catalisa a oxidação e ciclização do ácido araquidônico até o hidroperóxido prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>).

b) Atividade de peroxidase: catalisa a peroxidação do PGG<sub>2</sub> até o hidroxiperóxido prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).

A PGH<sub>2</sub> é quimicamente instável e é rapidamente convertido por sintases específicas em uma série de prostaglandinas e tromboxanos, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Figura 1).

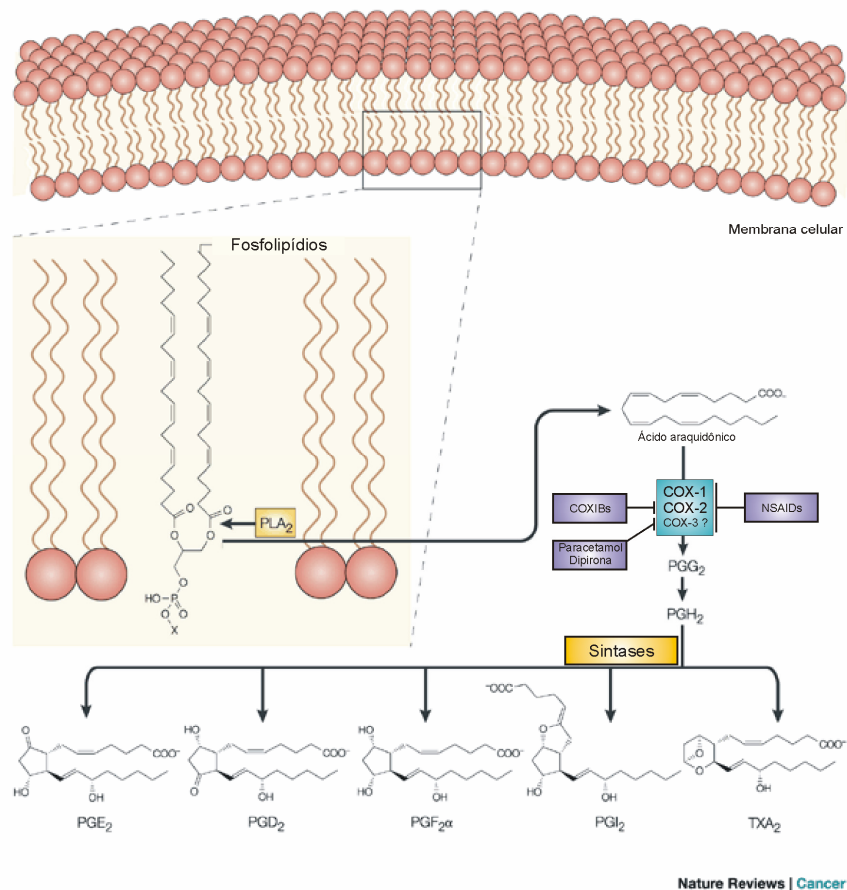


Figura 1: Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub>. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). No passo seguinte, a ciclooxygenase catalisa a formação PGG<sub>2</sub>, e em seguida a redução deste à PGH<sub>2</sub>. O PGH<sub>2</sub> é subsequentemente convertido em uma série de prostaglandinas, incluindo PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), pela atividade de sintases específicas. Duas isoformas de ciclooxygenase (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 ciclooxygenase (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).

Entre os avanços mais significantes no estudo da biologia dos eicosanóides nos últimos anos está a descoberta de que existem pelo menos duas isoformas de



ciclooxigenase. Pelo menos duas isoformas de ciclooxigenase foram caracterizadas em mamíferos, e denominadas COX-1 e COX-2. Ambas são alvos para ação das drogas antiinflamatórias não-esteroidais (Simmons et al., 2004), o inglês John Vane foi laureado com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1982 pela descoberta que a inibição da ciclooxigenase é o principal mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteroidais.

Em mamíferos, as isoformas de ciclooxigenase são produtos de dois genes diferentes. O gene que codifica a COX-1 foi clonado pela primeira vez em 1988 (DeWitt and Smith, 1988; Merlie et al., 1988; Yokoyama et al., 1988), ao passo que o gene que codifica a COX-2 foi clonado três anos mais tarde (Kujubu et al., 1991; Simmons et al., 1991). Ambos os genes codificam polipeptídeos de 70 kDa que possuem 60 % de semelhança na seqüência primária e que catalisam essencialmente a mesma reação de formação do PGH<sub>2</sub>. Embora a COX-1 e COX-2 sejam similares em alguns aspectos, existem diferenças importantes que estão sumarizadas na Tabela 1.

Parâmetro	COX-1	COX-2
Peso molecular (kDa)	71	71
Número de aminoácidos	576	587
Tamanho do gene (kb)	22	8.3
Tamanho de mRNA (kb)	2.8	4.5
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- $\gamma$ -linoleato	Ácido araquidônico Dihomo- $\gamma$ -linoleato Ácido eicosapentanoico Ácido linolênico Anandamida 2-araquidonil-glicerol

Tabela 1: Principais diferenças entre as isoformas de ciclooxigenase. MP, membrana plasmática; MR, membrana de retículo endoplasmático; MN, membrana nuclear.

Fonte: compilado de (Vane et al., 1998; Smith et al., 2000; Simmons et al., 2004).

A COX-1 é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos e acredita-se que seja responsável por funções de manutenção da homeostase do organismo, incluindo manutenção do tônus da musculatura lisa, agregação plaquetária, e proteção da mucosa gástrica (Vane et al., 1998). Uma variante de splice da COX-1 foi descoberta recentemente e chamada COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002). Esta enzima é expressa principalmente no sistema nervoso central e parece ser seletivamente inibida por algumas drogas analgésicas/antipiréticas como paracetamol e 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 et al., 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).

COX-2 é a isoforma cuja expressão é induzida na maioria dos tecidos, principalmente durante uma resposta inflamatória, com contribuição importante não só para o reparo da lesão, mas também para o desenvolvimento de lesão crônica (Vane et al., 1998). A COX-2 pode usar alguns outros ácidos graxos e endocanabinóides como anandamida e 2-araquidonil-glicerol como substratos. Recentemente tem sido proposto que o metabolismo de endocanabinóides pela COX-2 é um mecanismo importante de regulação das funções desses neuromoduladores (Kim and Alger, 2004; Slanina et al., 2005; Slanina and Schweitzer, 2005).

Com relação à estrutura protéica, há uma diferença crucial no sítio ativo que catalisa a reação de ciclooxygenase, 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 de 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.

Assim, outro avanço importante na biologia dos eicosanóides foi o surgimento de inibidores seletivos da COX-2, que, em princípio, poderiam ser úteis na supressão de processos inflamatórios sem desencadear os efeitos adversos relacionados com a inibição não-seletiva das várias isoformas da ciclooxygenase (Patrignani et al., 2005). Contudo, este tema ainda permanece motivo de significativo debate embora isto permaneça motivo de debate significativo na literatura (Warner and Mitchell, 2004). Vários inibidores seletivos da COX-2 estão disponíveis atualmente no mercado, tanto para pesquisa básica como para uso na clínica. Um dos inibidores seletivos da COX-2 mais utilizados atualmente é o celecoxib (Celebra<sup>TM</sup>, Pfizer), que está aprovado pela Food and Drug Administration para o tratamento de várias condições inflamatórias, incluindo osteoartrite, artrite reumatóide e dor aguda.

Apesar da grande importância da indução expressão da COX-2 em situações de resposta inflamatória, é muito importante mencionar que a COX-2 também é expressa

de maneira constitutiva em alguns poucos tecidos, como o cérebro (Yamagata et al., 1993; Sang and Chen, 2006).

## 1.2. COX-2 e prostaglandinas no cérebro

A presença de prostaglandinas no cérebro foi demonstrada pela primeira vez por Samuelsson, em 1964 (Samuelsson, 1964). Em 1993 foi demonstrada pela primeira vez a presença da COX-2 neste tecido (Yamagata et al., 1993). Além disso, Yamagata e colaboradores mostraram que os níveis basais de COX-2 no cérebro são regulados por atividade neuronal, e são aumentados por estimulação em alta frequência associada à indução de potencialização de longa duração (Yamagata et al., 1993).

A COX-2 no cérebro é encontrada principalmente no córtex, hipocampo e hipotálamo, principalmente em neurônios, mas também células não-neuronais, como astrócitos, células da microglia, células da meninge e do plexo coróide (Vane et al., 1998). Quantitativamente, a COX-2 é mais abundante em neurônios glutamatérgicos do hipocampo e cortex 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 PGE<sub>2</sub> sintase, já que esta enzima está co-localizada com a COX-2 (Bosetti et al., 2004). Como consequência, a maior parte do PGH<sub>2</sub> produzido na reação da COX-2 é rapidamente convertido em PGE<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> como um efetor chave na via de sinalização da COX-2 e tornando difícil uma dissociação entre as funções mediadas pela COX-2 por esta prostaglandina (Sang and Chen, 2006). Acredita-se que a maioria das ações mediadas

pela PGE<sub>2</sub> sejam exercidas após ativação de um de seus receptores cognatos, que foram denominados receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> (Narumiya et al., 1999). Todos esses receptores possuem a arquitetura de sete domínios transmembrana característica de receptores acoplados à proteína G, embora cada um deles seja codificado por um gene distinto e promovam respostas celulares através da ativação de diferentes tipos de proteína G. As cascatas de sinalização ativadas pelos diferentes receptores EP são mostradas na Tabela 2.

Tipo	Subtipo	Proteína G	Cascata de sinalização
EP <sub>1</sub>	-	Gq	PLC; ↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> e ↑ PKC
EP <sub>2</sub>	-	Gs	AC; ↑ AMPc
EP <sub>3</sub>	EP <sub>3A</sub>	Gi	AC; ↓ AMPc
	EP <sub>3B</sub>	Gs	AC; ↑ AMPc
	EP <sub>3C</sub>	Gs	AC; ↑ AMPc
	EP <sub>3D</sub>	Gs	AC; ↑ AMPc
		Gi	AC; ↓ AMPc
EP <sub>4</sub>	-	Gq	PLC; ↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> e ↑ PKC
		Gs	AC; ↑ AMPc

Tabela 2: Tipos e subtipos de receptores EP e respectivas cascatas de sinalização. O símbolo ↑ significa aumento/ativação enquanto que o símbolo ↓ significa diminuição/inibição. PLC, fosfolipase C; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, concentração intracelular de íons cálcio; PKC, proteína quinase C; AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico.

Fonte: adaptado de Narumiya et al. (1999).

### 1.3. Papel fisiológico da COX-2 e da PGE<sub>2</sub> no cérebro

Devido a sua expressão constitutiva no cérebro, é interessante a possibilidade de que a COX-2 e seu principal metabólito, a PGE<sub>2</sub>, participem de um grande número de funções fisiológicas neste tecido. De fato, evidências sugerem que a COX-2 e a PGE<sub>2</sub> participam da regulação de processos cerebrais importantes, incluindo o ciclo sono/vigília, termoregulação e aprendizado e memória (Yamagata et al., 1993; Gerozissis et al., 1995; Hayaishi and Matsumura, 1995; Boulant et al., 1997; Reppert and Weaver, 2002; Teather et al., 2002; Rall et al., 2003; Ivanov and Romanovsky, 2004).

### 1.3.1. Ciclo sono/vigília

A regulação do ciclo sono/vigília ocorre principalmente por interações entre mecanismos intrínsecos do relógio circadiano, o nosso “relógio biológico” que está situado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior, e um processo homeostático controlado por substâncias endógenas reguladoras do sono (Reppert and Weaver, 2002). Evidências experimentais apontam a PGD<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub> como alguns dos principais mediadores que regulam o ciclo sono/vigília. De fato, a injeção intracerebral de PGD<sub>2</sub> induz sono fisiológico ortodoxo (tipo REM) e paradoxal (tipo não-REM) em várias espécies de mamíferos, ao passo que a injeção de PGE<sub>2</sub> induz estado de vigília (Hayaishi and Matsumura, 1995). Além disso, usando técnicas de microdiálise e eletroencefalografia, Gerozissis e colaboradores (1995) mostraram que os níveis de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo de ratos eram mais altos durante o período de vigília do que durante o período de sono, e a chegada de cada um destes períodos poderia ser presumida pelos níveis hipotalâmicos de PGE<sub>2</sub>, fortalecendo a idéia de um papel importante para a PGE<sub>2</sub> na regulação do ciclo sono/vigília.

### 1.3.2. Termoregulação e febre

O centro termorregulatório localiza-se na área pré-óptica do hipotálamo anterior 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 et al., 1997). Tem sido demonstrado que a PGE<sub>2</sub> é mediador chave nesses processos. De fato, a PGE<sub>2</sub> altera a taxa de disparo de neurônios pré-ópticos, principalmente através da ativação de receptores EP<sub>3</sub> na área pré-óptica do hipotálamo anterior (Ivanov and Romanovsky, 2004; Blatteis et al., 2005). A ativação destes receptores provoca diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, e conseqüentemente diminuição da atividade neuronal (Steiner et al., 2002; Ivanov and Romanovsky, 2004). Como resultado, ocorre a inibição de neurônios sensíveis ao calor (promovendo a conservação de calor) e a excitação de neurônios termoinsensíveis (estimulando a produção de calor), culminando assim com o aumento da temperatura central (Ivanov and Romanovsky, 2004).

### 1.3.3. Aprendizado e memória

A observação por Yamagata e colaboradores (1993) de que a expressão basal da COX-2 no cérebro era proporcional aos níveis de atividade neuronal e aumentada por estimulação em alta frequência associada à indução de potencialização de longa duração forneceu uma das primeiras pistas que a COX-2 poderia estar envolvida em processos relacionados com aprendizado e memória, uma vez que a LTP é um importante evento para o processamento de informações (Bliss and Collingridge, 1993). De fato, a injeção

sistêmica pós-treino de um inibidor seletivo da COX-2 (NS-398), mas não da COX-1 (piroxicam) aumenta o tempo necessário para o animal localizar a plataforma escondida no labirinto aquático de Morris (Teather et al., 2002), sugerindo um papel para a COX-2 na consolidação da memória neste tipo de tarefa. Além disso, a infusão intrahipocampal pré-treino de celecoxib (inibidor seletivo da COX-2), mas não de indometacina (inibidor não-seletivo das isoformas) piora 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.

#### 1.4. Papel patológico da COX-2 e da PGE<sub>2</sub> no cérebro

Estudos recentes têm mostrado uma participação importante da COX-2 e PGE<sub>2</sub> em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas associadas com alto grau de morbimortalidade e com alta incidência na população em geral. Aqui será dada ênfase às situações neurodegenerativas agudas, como isquemia, trauma-crânio-encefálico, convulsões e epilepsia.

##### 1.4.1. Isquemia

Estudos têm mostrado que a expressão da COX-2 no cérebro aumenta após isquemia cerebral tanto em modelos animais (Collaco-Moraes et al., 1996; Miettinen et al., 1997) quanto cérebros de humanos após episódio isquêmico letal (Sairanen et al., 1998; Iadecola et al., 1999). A extensão da lesão 24 h após oclusão permanente da artéria cerebral média é proporcional ao aumento na expressão da COX-2 no cérebro de ratos (Collaco-Moraes et al., 1996), sugerindo um papel central para esta enzima na



neurodegeneração induzida pela isquemia. Mais evidências de que a COX-2 é importante para neurodegeneração induzida pela isquemia vêm dos estudos que mostraram que a inibição seletiva da COX-2 diminui o tamanho de lesão cerebral após isquemia (Nogawa et al., 1997), mesmo quando administrada 24 h após o evento isquêmico (Candelario-Jalil et al., 2002). Além disso, camundongos transgênicos que superexpressam COX-2 humana são mais susceptíveis ao dano causado pela isquemia cerebral (Dore et al., 2003), enquanto os camundongos nocaute que são deficientes nesta enzima são mais resistentes (Iadecola et al., 2001).

A participação diversos receptores EP na lesão causada por isquemia cerebral começou a ser investigada recentemente. Um estudo de Kawano e colaboradores (2006) mostrou que a ativação de receptores EP1 diminui o tamanho da lesão cerebral induzida por isquemia, fornecendo a primeira evidência do envolvimento de um receptor para PGE<sub>2</sub> neste tipo de situação neurodegenerativa.

#### 1.4.2. Trauma crânio-encefálico

O trauma crânio-encefálico frequentemente resulta de concussões cerebrais e pode ocasionar déficit neurológico e neurodegeneração através de danos diretos causados pela pancada em si, como por exemplo, ruptura de vias neuronais ou através de mecanismos secundários que ocorrem de minutos a dias após a concussão (Faden and Salzman, 1992). Um desses eventos secundários é o aumento na expressão e atividade da COX-2 (Dash et al., 2000; Strauss et al., 2000; Gopez et al., 2005).

De maneira semelhante ao visto na isquemia, a inibição seletiva da COX-2 se mostra neuroprotetora em vários modelos experimentais de trauma crânio-encefálico, com raras exceções. A administração de nimesulida no modelo de impacto-aceleração

(Cernak et al., 2001, 2002) ou de DFU no modelo de percussão fluída (Gopez et al., 2005) resulta em diminuição da lesão e melhora nos déficits cognitivos induzidos pelo trauma crânio-encefálico. Por outro lado, A inibição seletiva da COX-2 com celecoxib no modelo do impacto cortical controlado não teve efeito sobre a piora da performance dos animais no labirinto aquático de Morris induzida pelo trauma crânio-encefálico e facilitou a piora da performance dos animais no teste do “beam walk”, ocasionando um número maior de quedas (Dash et al., 2000). Em conjunto, estes resultados sugerem que o tipo de modelo de trauma crânio-encefálico é crítico para definição do papel da COX-2 neste tipo de situação neurodegenerativa.

#### 1.4.3. Convulsões e epilepsia

O papel da COX-2 e da PGE<sub>2</sub> em diversos modelos experimentais de convulsões e epilepsia começou a ser investigado a partir da metade da década de 1990, com o trabalho de Chen e colaboradores (1995), que mostrou aumento na expressão da COX-2 após as convulsões induzidas por cainato. É interessante mencionar que humanos com epilepsia do lobo temporal e camundongos geneticamente susceptíveis à convulsões mostram aumento da expressão da COX-2 no cérebro, fortalecendo a idéia de que esta enzima pode ter um papel importante em convulsões e na epilepsia.

Os resultados encontrados em modelos animais de convulsão e epilepsia desde o trabalho de Chen e colaboradores (1995) são bastante variados, desde que tem sido demonstrado tanto um papel facilitatório quanto um papel inibitório para COX-2 em modelos animais de convulsão e epilepsia. Mesmo a falta de efeito de inibidores seletivos da COX-2 tem sido demonstrada nesses modelos. As razões para estas discrepâncias não estão estabelecidas, mas é possível que o modelo animal escolhido, a

via e os tempos de administração possam ser críticos para os resultados encontrados, assim como em modelos de trauma crânio-encefálico (ver discussão acima).

Tem sido mostrado que a inibição seletiva da COX-2 com celecoxib reduz a porcentagem de animais que exibem extensão tônica dos membros traseiros induzida por eletrochoque, e aumenta a latência para as convulsões induzidas por inalação de fluorotil em ratos neonatos (Kim and Jang, 2006). Além disso, a administração de celecoxib atenua a neurogênese e as convulsões recorrentes induzidas por pilocarpina (Jung et al., 2006), sugerindo que a COX-2 poderia ter um papel facilitatório nas convulsões induzidas por estes agentes.

O papel da COX-2 nas convulsões induzidas por cainato permanece um tanto controverso. Baik e colaboradores (1999) reportaram que a administração sistêmica de celecoxib agrava as convulsões e aumenta a taxa de mortalidade e lesão hipocampal induzidas por cainato. Por outro lado, camundongos transgênicos que superexpressam a COX-2 exibem um agravamento das convulsões e maior taxa de mortalidade após injeção deste agente convulsivante (Kelley et al., 1999), trazendo resultados aparentemente conflitantes.

O efeito de inibidores seletivos da COX-2 também foi avaliado com resultados conflitantes nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol PTZ, desde que igualmente falta de efeito e um efeito anticonvulsivante dessas drogas foi encontrado. Enquanto Akarsu e colaboradores (2006) mostraram que o inibidor seletivo da COX-2, SC-58236 (20 or 40 mg/kg, s.c.), não teve efeito sobre as convulsões induzidas por PTZ, Dhir e colaboradores (2006) reportaram que rofecoxib 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, permanece um tanto desconhecido, assim como a participação da PGE<sub>2</sub> nesses modelos experimentais.

O entendimento do papel da COX-2 e da PGE<sub>2</sub> nas convulsões induzidas por PTZ é de especial interesse pelo fato de que este agente convulsivante tem sido largamente utilizado para indução de um modelo animal de epilepsia e epileptogênese que tem fornecido importantes informações a respeito dos mecanismos básicos da fisiopatologia desta doença e também como uma droga bastante útil na busca de novas drogas com ação anticonvulsivante e neuroprotetora (Pitkänen et al., 2006).

### 1.5. Carbonilação de proteínas

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são continuamente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando as espécies reativas são produzidas em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, elas podem causar prejuízo na função celular, apoptose e necrose (Halliwell and Gutteridge, 1999), caracterizando o “estresse oxidativo”. Esse desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas e as defesas antioxidantes pode representar um mecanismo fundamental para as doenças em seres humanos (Halliwell and Gutteridge, 1999). A produção de espécies reativas pode ser estimada pela determinação dos produtos formados após reação com proteínas, lipídios ou DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999).

A determinação de grupos carbonil nas proteínas oxidadas é um dos métodos bioquímicos mais utilizados na investigação dos efeitos do estresse oxidativo em proteínas (Levine et al., 2000; Dalle-Donne et al., 2003b). As proteínas podem sofrer modificações de grupos tióis e nitrosilação de grupos fenólicos acarretando na fragmentação na cadeia polipeptídica. Particularmente, os aminoácidos histidina, arginina e lisina são os principais alvos das espécies reativas para a produção de grupos

carbonil ( $>C=O$ ). O conteúdo de grupos carbonil nas proteínas pode ser medido após a reação deste grupo com 2,4-dinitrofenil-hidrazina para formar 2,4-dinitrofenil-hidrazona, que pode ser detectada e quantificada espectrofotometricamente ou imunoquimicamente (Levine et al., 2000; Dalle-Donne et al., 2003b).

A carbonilação de proteínas pode ocasionar perda nas funções das mesmas e aumentar a susceptibilidade à proteólise, e assim a carbonilação de proteínas tem sido implicada na etiologia ou progressão de várias doenças (Levine et al., 2000; Levine, 2002; Dalle-Donne et al., 2003b). A carbonilação de proteínas, um dos marcadores de estresse oxidativo do cérebro, está aumentada na neurodegeneração relacionada com a idade, ou em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Dalle-Donne et al., 2003a), e também em modelos de convulsões induzidos por PTZ (Oliveira et al., 2004), ácido metilmalônico (Ribeiro et al., 2005) e ácido glutárico (Figuera et al., 2006).

#### 1.6. $Na^+,K^+$ -ATPase

A  $Na^+,K^+$ -ATPase é uma enzima de membrana plasmática responsável por manter a homeostase iônica celular. Esta enzima utiliza o ATP para exportar 3 íons  $Na^+$  para o meio extracelular e importar 2 íons  $K^+$  para o meio intracelular, e usa  $Mg^{2+}$  como cofator (Jorgensen et al., 2003). A  $Na^+,K^+$ -ATPase é fundamental para a manutenção do potencial de membrana de repouso e para a propagação do impulso nervoso e um prejuízo ao funcionamento desta enzima ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido (Grisar et al., 1992).

Existem evidências de que as espécies reativas podem estar relacionadas com convulsões (Patel, 2004) e com diminuição na atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase, uma vez

que estas podem alterar o estado redox de grupos sulfidrílicos e outros resíduos regulatórios no sítio ativo da enzima (Morel et al., 1998). De fato, a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase com ouabaína causa o aparecimento de convulsões e concomitante lipoperoxidação (Jamme et al., 1995). Além disso, o grau de inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzido pela administração intracerebral de ácido metilmalônico ou de ácido glutárico se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por estes agentes (Fighera et al., 2006; Furian et al., 2006), reforçando o papel importante da inibição da atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nas convulsões induzidas por diversos agentes.

---

## **2 OBJETIVO**

## 2. Objetivo

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi investigar o papel da cicloxigenase-2 e da prostaglandina E<sub>2</sub> nas convulsões, carbonilação de proteínas e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ.

### 2.1. Hipóteses

As hipóteses que foram testadas neste trabalho foram:

1. Inibidores da COX-2 têm ação anticonvulsivante e previnem a carbonilação de proteínas e inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ.
2. Anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> têm ação anticonvulsivante e previnem a carbonilação de proteínas e inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ.
3. A administração PGE<sub>2</sub> causa convulsão *per se* e facilita as convulsões induzidas por PTZ.



## **CAPÍTULO II**

---

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

**COX-2/PGE<sub>2</sub> PATHWAY FACILITATES SEIZURES AND NA<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPASE  
ACTIVITY INHIBITION INDUCED BY PENTYLENETETRAZOL**

Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Luiz Fernando Freire  
Royes, Michele Rechia Figuera, Natália Gindri Fiorenza, Marcelo  
Castelli, Pablo Machado, Juliano Ferreira, Esper Abraão Cavalheiro,  
Carlos Fernando Mello

**Submetido à *Neuroscience***

**COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway facilitates seizures and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition  
induced by pentylentetrazol**

Mauro Schneider Oliveira<sup>1</sup>, Ana Flávia Furian<sup>1</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>2</sup>,  
Michele Rechia Fighera<sup>1</sup>, Natália Gindri Fiorenza<sup>1</sup>, Marcelo Castelli<sup>1</sup>, Pablo Machado<sup>4</sup>,  
Esper Abraão Cavalheiro<sup>3</sup>, Juliano Ferreira<sup>4</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Métodos e Técnicas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Neurologia Experimental, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Work supported by CNPq, FAPERGS, CAPES

\* Corresponding author: Dr. Carlos Fernando Mello  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.  
FAX: +55 55 3220 8241  
e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

## List of abbreviations

ANOVA, analysis of variance

CNS, central nervous system

COX, cyclooxygenase

DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

GABA,  $\gamma$ -amino-butyric-acid

NMDA, *N*-methyl-d-aspartate

NS-398, *N*-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide

PBS, sterile phosphate-buffered saline

PGD<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>

PLC, phospholipase C

PTZ, pentylenetetrazol

SC-58236, (4-[5-(4-chlorophenyl)-3-trifluoromethyl]-1*H*-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide

## Abstract

Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme in the metabolic pathway where arachidonic acid is converted to prostaglandins. COX-2 is the isoform of cyclooxygenase which is inducible at injury/inflammation sites and expressed constitutively in a few tissues, such as the central nervous system. It has been suggested that COX-2 plays a role in several disorders, including convulsive behavior. In this study we tested whether celecoxib, a selective COX-2 inhibitor (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) protects against the convulsions, protein carbonylation and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by pentylenetetrazol (PTZ; 60 mg/kg, i.p.), a classical convulsant agent that has been fairly used for the study of epilepsy and screening of new compounds with antiepileptic activity. The systemic administration of celecoxib (2 mg/kg) attenuated PTZ-induced behavioral and electroencephalographic seizures and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex of rats, suggesting a facilitatory role for COX-2 on the PTZ-induced effects. Since there is a bulk of evidence showing that PGE<sub>2</sub> is a key mediator in COX-2 signaling, we decided to investigate the effect of the intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> antibodies (4 μg/2 μl, i.c.v.) on the convulsive episodes and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by PTZ. Administration of anti-PGE<sub>2</sub> antibodies attenuated PTZ-induced behavioral and electroencephalographic seizures and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex of rats. In a reverse approach, we showed that intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> (100 ng/2 μl, i.c.v.) did not cause electrographic alterations *per se*, but elicits electroencephalographic convulsions if given in combination with a subconvulsant dose of PTZ (20 mg/kg, i.p.), further suggesting an important role for this prostaglandin in the convulsant effects of

PTZ. Collectively, these data support a facilitatory role for the COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway in PTZ-induced convulsions and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition.

Key words: cox-2 inhibitor, celecoxib, epilepsy, anti-PGE<sub>2</sub> antibodies, EEG

Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme in the metabolic pathway where arachidonic acid is converted to prostaglandins, which are potent mediators of inflammation (Vane et al., 1998, Simmons et al., 2004). Three COX isozymes were identified, and termed COX-1, COX-2 and COX-3 (Simmons et al., 2004). COX-2 is the isoform which is inducible at injury/inflammation sites and expressed constitutively in a few organs, such as the central nervous system (CNS) (Vane et al., 1998). In the CNS, COX-2 is localized in excitatory neuronal dendrites (Kaufmann et al., 1996), particularly in the hippocampus and cortex (Yamagata et al., 1993). Although COX-2 is constitutively expressed in the CNS, COX-2 expression may also be up-regulated by physiological events, such as high-frequency stimulation (Yamagata et al., 1993, Kaufmann et al., 1996). In fact, it has been suggested that COX-2 contributes to regulation of important cerebral physiological processes, such as control body temperature, appetite, sleep and wake cycle and learning and memory processes (Kaufmann et al., 1997).

Despite its involvement in the normal functioning of the CNS, it has been suggested that COX-2 plays a role in some neurological disorders, such as Alzheimer's disease (Melnikova et al., 2006), cerebral ischemia (Nakayama et al., 1998), traumatic brain injury (Cernak et al., 2001) and epilepsy (Vezzani and Granata, 2005). In fact, patients with temporal lobe epilepsy and genetically seizure-susceptible El mice have increased COX-2 expression in brain (Okada et al., 2001, Desjardins et al., 2003). Moreover, it has been demonstrated that COX-2 knockout mice are resistant to electrical kindling development (Takemiya et al., 2003), and that transgenic mice overexpressing neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions (Kelley et al., 1999), suggesting that COX-2 may have a critical role in convulsive states.



The involvement of COX-2 in the convulsions elicited by electroshock (Shafiq et al., 2003) and pilocarpine (Jung et al., 2006) has also been studied. However, the effects of selective COX-2 inhibitors on the convulsions induced by pentylenetetrazol (PTZ) are conflicting, since selective COX-2 inhibitors have been reported to protect (Dhir et al., 2006) or have no effect (Akarsu et al., 2006) on the convulsions induced by PTZ. Therefore, in the current study, we decided to further investigate the role COX-2 and the PGE<sub>2</sub> pathway in the behavioral and electrographic seizures, protein carbonylation and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition induced by PTZ.

## Experimental Procedures

### Animal and reagents

Adult male Wistar rats (200-250 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. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee.

Reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies, which were obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) and PGE<sub>2</sub>, which was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Celecoxib was extracted from commercially available capsules (Celebra®, Pfizer, São Paulo, SP, Brasil). Its identity and purity was checked by nuclear resonance methods and was > 95%.

### Drug administration protocol

The effect of the systemic administration of the selective COX-2 inhibitor celecoxib on the neurochemical alterations (protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity) and seizure activity induced by PTZ was investigated by administering to the animals increasing doses of celecoxib (0.2; 2 or 20 mg/kg, p.o.) or its vehicle (0.1% carboxymethylcellulose plus 5% Tween 80, p.o.), 60 min prior to the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.) or sterile saline solution (0.9% NaCl, i.p.).

The effect of the intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies on neurochemical alterations and seizure activity induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.) was investigated by injecting the animals with anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies (4 µg/2 µl, i.c.v.) or its vehicle (sterile phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4), 15 min before PTZ administration.

The effect of the intracerebroventricular administration of increasing doses of PGE<sub>2</sub> on seizure activity and neurochemical alterations induced by a subconvulsive dose of PTZ was investigated by injecting the animals with increasing doses of PGE<sub>2</sub> (1; 10 or 100 ng/2 µl, i.c.v.) or its vehicle (sterile phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) 15 min before PTZ (20 mg/kg, i.p.) administration.

All intracerebroventricular injections were performed by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below a guide cannula. Animals were anesthetized with Equitesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, 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. 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 three days after the surgical procedure.

#### Behavioral seizure evaluation

Immediately after the PTZ injection the animals were transferred to a round open field (54.7 cm in diameter). During 20 min the animals were videomonitoring for the appearance of convulsive episodes. PTZ induces convulsive activity which can be differentiated in four stages (Ferraro et al., 1999):

Stage 1: Hypoactivity. This phase represents a nonconvulsive state characterized by reduced motor activity (hypoactive state) with animals exhibiting a prone or crouched posture and a characteristic direct contact of the abdomen with the cage bottom.

Stage 2: Clonic convulsions: These episodes are characterized by typical partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Such clonic events are short, typically lasting 1-2 sec and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization and over time.

Stage 3: Generalized convulsions: These episodes are characterized by generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. The duration of generalized convulsions was variable but typically involved behavioral changes lasting for 30-60 sec followed by a quiescent period.

Stage 4: Maximal convulsions. Initially, this stage is indistinguishable from stage 3. However, when evolving to stage 4, animals exhibit maximal convulsive

activity characterized by tonic extension of hindlimbs normally associated with death due to respiratory insufficiency. The dose of PTZ used in the present study (60 mg/kg) did not induce stage 4-like convulsions in the 20 min observation period.

During the 20-min observation period, the latencies for the first clonic and first generalized convulsions were measured. In addition, the total time spent in generalized convulsions was recorded. Seizure activity was confirmed electrographically in a subset of animals (n=3 per group), as described below.

### EEG recordings

Animals were surgically implanted with a cannula and electrodes under stereotaxic guidance. In brief, rats were deeply anesthetized with Equitesin (3 ml/kg, i.p.). Two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100  $\mu$ m) were implanted unilaterally into the hippocampus. I.c.v. infusions of drugs were carried out by a guide cannula, which was glued to a multipin socket, and inserted through a previously opened skull orifice. The coordinates from bregma for implantation of the electrodes 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 injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. The experiments were performed 7-9 days after surgery.

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 the EEG recording. The rats were then connected to the lead socket in a swivel inside a

Faraday's cage. Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. The protocol of drug injection used in this set of experiments was the same used as described in "Drug administration protocol" section, except that EEG was concomitantly recorded. EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass) and recorded using an analogical encephalographer (Berger TP 119). Thirty seconds epochs were selected to determine significant EEG changes. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ( $\geq 1.5$  X baseline); multiple sharp waves ( $\geq 2$  X baseline) in brief spindle episodes ( $\geq 1$  sec  $\geq 5$  sec); multiple sharp waves ( $\geq 2$  X baseline) in longer spindle episodes ( $\geq 5$  sec); spikes ( $\geq 2$  X baseline) plus slow waves; multispikes ( $\geq 2$ X baseline,  $\geq 3$  spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm,  $\geq 5$  sec). Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts, and such artifacts were easily identified and discarded.

Colorimetric determination of protein carbonyl content *ex vivo* and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity

Immediately after the behavioral evaluation, the animals were sacrificed by decapitation and their brains were rapidly removed. Cortex and hippocampus were dissected and promptly homogenized in 10 volumes (w/v) of ice-cold 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), using a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity were determined in tissue homogenates, as described in detail elsewhere (Oliveira et al., 2004).

Protein determination

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

#### Statistical analysis

Behavioral data were analyzed by a Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). Data from total protein carbonylation and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity determinations were analyzed by a three way ANOVA, with the structure (hippocampus or cortex) treated as a within-subject factor. *Post hoc* analyses were carried out by the F test for simple effect or the Student Newman Keuls test, when appropriate. Data from behavioral analysis are presented as median and interquartile ranges. Data from neurochemical experiments are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $P < 0.05$  was considered significant, and  $P$  and  $F$  values are shown only if  $P < 0.05$ .

#### Results

Figures 1A-C show the effect of increasing doses of celecoxib on the latency for the first clonic and generalized convulsion induced by PTZ. Statistical analysis (Kruskall-Wallis test followed by nonparametric multiple comparisons Dunn test) revealed that celecoxib, at the dose of 2 mg/kg, increased the latency for the first clonic [ $H(3)=12.18$ ;  $P < 0.01$ , Figure 1A] and first generalized [ $H(3)= 11.76$ ;  $P < 0.01$ , Figure 1B] convulsion. The duration of generalized convulsions induced by PTZ was also reduced [ $H(3)= 12.58$ ;  $P < 0.01$ , Figure 1C] in animals injected with celecoxib (2 mg/kg, i.p.). The other doses of celecoxib tested (0.2 or 20 mg/kg) had not effect on behavioral seizures elicited by PTZ.

EEG recordings confirmed the behavioral seizures elicited by PTZ (Figure 2A-B) and their attenuation by orally administered celecoxib at the dose of 2 mg/kg (Figure 3A-B). Simultaneous electrographic recording of the hippocampus and cerebral cortex revealed that systemic administration of PTZ caused the appearance of seizure activity in the hippocampus, which spread to the cerebral cortex (Figure 2B). In the hippocampus, PTZ-induced seizure activity was characterized by the occurrence of multispikes plus slow waves (Figure 2A, event 1) and major seizure activity (Figure 2A, event 2). In the cerebral cortex, PTZ caused the appearance of seizure activity consisting of multiple sharp waves in brief spindle episodes (Figure 2A, event 3). Celecoxib (2 mg/kg, p.o.) administration did not prevent PTZ-induced seizure activity in cerebral cortex (Figure 3B), but fully prevented seizures activity in the hippocampus (Figure 3B), confirming the initial experiments that showed the protective effect of celecoxib against the behavioral convulsions induced by the GABAergic antagonist (Figure 1).

The effect of PTZ and increasing doses of celecoxib on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of the hippocampus and cerebral cortex was also evaluated (Table 1). Statistical analysis revealed that celecoxib at 2 mg/kg prevented PTZ-induced Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition either in hippocampus and cerebral cortex [significant pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment (NaCl or PTZ) interaction: F(3,63)=4.55; *P* < 0.05]. The other doses of celecoxib tested (0.2 or 20 mg/kg) had not effect on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition elicited by PTZ. In addition, the effect of PTZ and increasing doses of celecoxib on protein carbonyl content of the hippocampus and cerebral cortex was also evaluated (Table 1). Neither PTZ nor celecoxib at all doses tested modified the protein carbonyl content of the hippocampus and cerebral cortex.

Since PGE<sub>2</sub> is quantitatively the major prostaglandin synthesized through the COX-2 pathway in mammalian brain (Vidensky et al., 2003, Sang et al., 2005), and there is a bulk of evidence showing that PGE<sub>2</sub> is a key mediator in COX-2 signaling (Chen et al., 2002, Carlson, 2003, Manabe et al., 2004, Chen and Bazan, 2005, Sang et al., 2005), we decided to investigate the effect of the intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies, which bind and specifically neutralize endogenous PGE<sub>2</sub>, on the convulsive episodes elicited by PTZ (Figure 4). Statistical analysis revealed that the administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies increased the latency for the first clonic convulsion [H(1)=5.73; *P* < 0.05] and reduced the number of clonic convulsions [H(1)=4.37; *P* < 0.05] elicited by PTZ. In addition, Anti-PGE<sub>2</sub> antibodies increased the latency for the first generalized convulsion [H(1)=4.60; *P* < 0.05], but did not reduce the duration of the generalized convulsions elicited by PTZ.

EEG recordings confirmed the protective effect of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies against PTZ-elicited behavioral seizures (Figure 5). Simultaneous electrographic recording of the hippocampus and cerebral cortex revealed that anti-PGE<sub>2</sub> antibodies prevented ictal activity induced by PTZ in the hippocampus (Figure 5). Intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies also prevented PTZ-induced Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex [significant pretreatment (vehicle or anti-PGE<sub>2</sub>) by treatment (NaCl or PTZ) interaction: F(1,39)=5.48; *P* < 0.05, Table 2]. PTZ and anti-PGE<sub>2</sub> did not modify the protein carbonyl content of the hippocampus and cerebral cortex (Table 2).

To further examine the role of the COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway in the convulsive episodes elicited by PTZ, we decided to investigate whether the intracerebroventricular administration of increasing doses of PGE<sub>2</sub> would elicit behavioral or eletrographic



seizures in animals treated with a subconvulsant dose of PTZ (20 mg/kg). PTZ, at this dose, did not cause behavioral or electrographic alterations (data not shown). PGE<sub>2</sub> (1-100 ng) alone, or in combination with a subconvulsant dose of PTZ did not cause behavioral seizures. However, electrographic recording of the hippocampus and cerebral cortex revealed that the combination of a subconvulsant dose of PTZ (20 mg/kg) with PGE<sub>2</sub> (100 ng) caused the appearance of multiple sharp waves in brief spindle episodes in cerebral cortex (Figure 6). These episodes persisted up to approximately 10 minutes after the administration of PTZ, and disappeared progressively in such way that at the end of the observation period (20 minutes) no electrographic alterations were detected. In this set of experiments not alterations in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity or protein carbonyl content of the hippocampus and cerebral cortex were identified (Table 3).

## Discussion

In the current study we showed that both the systemic injection of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, and the intracerebroventricular administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies decrease PTZ-induced behavioral and electroencephalographic seizures and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition in the hippocampus and cerebral cortex of rats. In addition, we showed that intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub>, at a dose that does not cause electrographic alterations *per se*, elicits electroencephalographic convulsions if given in combination with a subconvulsant dose of PTZ.

Accumulating evidence suggests that COX-2 plays a role in several neurological disorders, including epilepsy (Vezzani and Granata, 2005). For instance, patients with temporal lobe epilepsy and the genetically seizure-susceptible El mice have increased

COX-2 expression in brain (Okada et al., 2001, Desjardins et al., 2003). Moreover, it has been demonstrated that COX-2 expression increases in brain during electrical kindling development (Tu and Bazan, 2003) and that transgenic mice overexpressing neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions (Kelley et al., 1999), suggesting that its products may facilitate the development of convulsive states. In fact, the protective effect of COX-2 inhibition against NMDA-mediated neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* was reverted by a PGE<sub>2</sub> synthetic analog (Carlson, 2003, Manabe et al., 2004). Specifically regarding PTZ, it is remarkable that PLA<sub>2</sub> and PLC activities are increased in the early stages of PTZ-induced seizures and that PGE<sub>2</sub> levels increase in the brain after systemic administration of PTZ (Lysz et al., 1987, Visioli et al., 1994). However, conflicting results have emerged about the effect of selective inhibitors of COX-2 on the convulsions elicited by PTZ, since both lack of effect and anticonvulsant actions for these compounds have been reported. While Akarsu et al. (2006) have shown that SC-58236 (20 or 40 mg/kg, s.c.) has no effect on the convulsions elicited by PTZ, Dhir et al. (2006) have shown that rofecoxib and nimesulide increase the latency for convulsions and decrease the duration of clonic convulsions elicited by PTZ, suggesting a modulatory role for COX-2 in the convulsive action of PTZ.

The results of the present study are in agreement with those reported by Dhir et al. (2006), since we found that celecoxib (2 mg/kg, p.o.) attenuated behavioral and electrographic convulsions elicited by PTZ. Importantly, here we show strong evidence suggesting a role for COX-2 and its product PGE<sub>2</sub>, in PTZ-induced convulsions. Three lines of evidence support a role for the COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway in the seizures induced by this GABAergic antagonist. First, COX-2 inhibition with celecoxib (2 mg/kg, p.o.) significantly attenuated PTZ-induced seizures, measured by behavioral (Figure 1) and

electrographic methods (Figure 3). Second, the administration of anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies decreased PTZ-induced seizures, also measured by behavioral (Figure 4) and electrographic methods (Figure 5). Third, intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub>, at a dose that does not cause electrographic alterations *per se*, elicits electroencephalographic convulsions if given in combination with a subconvulsant dose of PTZ (Figure 6).

Experimental evidence suggests that PGE<sub>2</sub> is a key mediator in COX-2 signaling (for a review, see Sang and Chen, 2006). Accordingly, it has been demonstrated that the selective COX-2 inhibitor NS-398 reduces somatic and dendritic membrane excitability in hippocampal slices (Chen and Bazan, 2005). Moreover, exogenous application of PGE<sub>2</sub>, but not of PGD<sub>2</sub> or PGF<sub>2α</sub>, increases frequency of firing, excitatory postsynaptic potentials amplitude and temporal summation in slices treated with NS-398 (Chen and Bazan, 2005). It has also been demonstrated that PGE<sub>2</sub> increased glutamate release from astrocytes (Bezzi et al., 1998), further suggesting an important role for PGE<sub>2</sub> in control excitatory transmission in brain. Therefore, a decrease in PGE<sub>2</sub> levels induced by celecoxib or anti-PGE<sub>2</sub> antibodies could result in decreased brain excitability and/or less sensitivity to PTZ.

Another interesting possibility is that not only a decrease in PGE<sub>2</sub>, but an increased PGD<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio may contribute for the anticonvulsant effects of celecoxib and anti-PGE<sub>2</sub> antibodies, since it has been demonstrated that administration of PGD<sub>2</sub> attenuates PTZ-induced convulsions (Bhattacharya and Parmar, 1987, Akarsu et al., 1998). Regarding this point, it has been suggested that the two COX isozymes are differently coupled with specific prostaglandin synthases (Ueno et al., 2001, Ueno et al., 2005), being PGE<sub>2</sub> produced preferentially by COX-2 and PGD<sub>2</sub> by COX-1. In line with this view, selective COX-2 inhibitor with NS-398 decreases brain levels of PGE<sub>2</sub>, but

not of PGD<sub>2</sub> (Sang et al., 2005). Therefore, inhibition of COX-2 by celecoxib or neutralization of PGE<sub>2</sub> by specific antibodies could result in decreased levels of PGE<sub>2</sub>, but not of PGD<sub>2</sub>, and ultimately decrease PTZ susceptibility. In agreement with hypothesis, PTZ-induced convulsions are increased by selective COX-1 inhibitors (Akarsu et al., 2006), which decrease PGD<sub>2</sub> levels but not PGE<sub>2</sub> levels.

It is also possible that a decrease in brain excitability following COX-2 inhibition may be related to endocannabinoid transmission. In this context, it has been showed that selective COX-2 inhibitors meloxicam or NS-398 decreased field excitatory postsynaptic potentials in hippocampal slices through a mechanism involving the CB1 endocannabinoid receptor, and not related to GABAergic mechanisms (Slanina and Schweitzer, 2005). Whether the currently reported protective effect of celecoxib against PTZ-elicited convulsions involves potentiation of endocannabinoid-mediated decrease of excitatory transmission still to be determined, but it is interesting to point out that an anticonvulsant effect of N-palmitoyl-ethanolamide, a putative endocannabinoid, against PTZ-elicited convulsions has been reported (Sheerin et al., 2004).

In this study we show that the systemic administration of PTZ does not alter protein carbonyl levels in hippocampus and cerebral cortex twenty minutes after its administration. Although in previous studies from our group we have found a significant increase in total protein carbonylation following intracerebral injection of PTZ (Oliveira et al., 2004, Ribeiro et al., 2005, Figuera et al., 2006), other groups have not found an increase in total protein carbonylation in hippocampus and cerebral cortex fifty minutes following systemic administration of PTZ (Patsoukis et al., 2004a, Patsoukis et al., 2004b). Therefore, it seems that the time after systemic administration is critical for the demonstration of the oxidative damage induced by PTZ, but one shall

also consider the possibility that total protein carbonylation may not reveal oxidative damage of selective vulnerable targets which would predispose to the development of convulsions and might correspond to a small fraction of total carbonyl content, such as the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

Although any cellular constituent may be a target for reactive species-elicited damage, some selected target failure may increase cellular excitability and facilitate the appearance of convulsions (Patel, 2004). Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is one of these targets because it is responsible for maintaining ion gradients across plasma membranes, and its inhibition causes seizures in mice (Jamme et al., 1995). Accordingly, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is particularly sensitive to reactive species, which alter plasma membrane lipid composition (Jamme et al., 1995) and the redox state of regulatory sulfhydryl groups as well as other amino acid residues (Morel et al., 1998). Further regarding inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by PTZ, it has been shown that this convulsant may directly inhibit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity through a direct interaction with the enzyme (Dubberke et al., 1998). Therefore, considering the sensitivity of to reactive species-induced damage and/or direct inhibition by PTZ, it is plausible that Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition reported here may contribute to PTZ-related hyperexcitability. Furthermore, the protection against enzyme inhibition afforded by celecoxib and anti-PGE<sub>2</sub> antibodies could result in an animal less sensitive to PTZ administration.

In summary, the present study reports an important role for COX-2 and PGE<sub>2</sub> in behavioral and electrographic convulsions and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition elicited by PTZ.

Acknowledgements

Work supported by CNPq (grants: 500120/2003-0 and 505527/2004-9), FAPERGS and CAPES. M.S. Oliveira, A.F. Furian, N.G. Fiorenza and C.F. Mello are the recipients of CNPq fellowships.

## References

- Akarsu ES, Mamuk S, Comert A (Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. *Epilepsy Res* 30:63-68.1998).
- Akarsu ES, Ozdayi S, Algan E, Ulupinar F (The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: Possible role of cyclooxygenase-2 induction. *Epilepsy Res*.2006).
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.1998).
- Bhattacharya SK, Parmar SS (Prostaglandin D2 inhibits pentylentetrazole-induced convulsions in rats by a serotonin-mediated mechanism. *Pharm Res* 4:406-408.1987).
- Bradford MM (A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.1976).
- Carlson NG (Neuroprotection of cultured cortical neurons mediated by the cyclooxygenase-2 inhibitor APHS can be reversed by a prostanoid. *J Neurosci Res* 71:79-88.2003).
- Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Mazzacoratti MG (Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res Suppl* 9:239-247; discussion 247-238.1992).
- Cernak I, O'Connor C, Vink R (Activation of cyclo-oxygenase-2 contributes to motor and cognitive dysfunction following diffuse traumatic brain injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:922-925.2001).

- Chen C, Bazan NG (Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93:929-941.2005).
- Chen C, Magee JC, Bazan NG (Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 87:2851-2857.2002).
- Desjardins P, Sauvageau A, Bouthillier A, Navarro D, Hazell AS, Rose C, Butterworth RF (Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochem Int* 42:299-303.2003).
- Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK (Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.2006).
- Dubberke R, Vasilets LA, Schwarz W (Inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump by the epileptogenic pentylenetetrazole. *Pflugers Arch* 437:79-85.1998).
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733-6739.1999).
- Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC, Mello CF (GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol Dis* 22:611-623.2006).
- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333-337.1995).



- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee S, Roh JK (Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 23:237-246.2006).
- Kaufmann WE, Andreasson KL, Isakson PC, Worley PF (Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 54:601-624.1997).
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (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* 93:2317-2321.1996).
- Kelley KA, Ho L, Winger D, Freire-Moar J, Borelli CB, Aisen PS, Pasinetti GM (Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 155:995-1004.1999).
- Lysz TW, Centra M, Markey K, Keeting PE (Evidence for increased activity of mouse brain fatty acid cyclooxygenase following drug-induced convulsions. *Brain Res* 408:6-12.1987).
- Manabe Y, Anrather J, Kawano T, Niwa K, Zhou P, Ross ME, Iadecola C (Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity. *Ann Neurol* 55:668-675.2004).
- McCull CD, Horne MK, Finkelstein DI, Wong JY, Berkovic SF, Drago J (Electroencephalographic characterisation of pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234-243.2003).

- Melnikova T, Savonenko A, Wang Q, Liang X, Hand T, Wu L, Kaufmann WE, Vehmas A, Andreasson KI (Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern. *Neuroscience* 141:1149-1162.2006).
- Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F (Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 33:531-540.1998).
- Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL, Nagayama T, Rose ME, Stetler RA, Isakson PC, Chen J, Graham SH (Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10954-10959.1998).
- Okada K, Yuhi T, Tsuji S, Yamashita U (Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. *Brain Res* 894:332-335.2001).
- Oliveira MS, Furian AF, Royes LFF, Figuera MR, Myskiw JD, Fiorenza NG, Mello CF (Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728.2004).
- Patel M (Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37:1951-1962.2004).
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA, Panagopoulos NT (Effect of pentylentetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. *Epilepsy Res* 62:65-74.2004a).
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus

- after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357:83-86.2004b).
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF (alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66:185-194.2005).
- Sang N, Chen C (Lipid signaling and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 12:425-434.2006).
- Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C (Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* 25:9858-9870.2005).
- Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P (Anticonvulsant action of celecoxib (alone and in combination with sub-threshold dose of phenytoin) in electroshock induced convulsion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25:87-90.2003).
- Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME (Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia* 45:1184-1188.2004).
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* 56:387-437.2004).
- Slanina KA, Schweitzer P (Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology* 49:653-659.2005).

- Takemiya T, Suzuki K, Sugiura H, Yasuda S, Yamagata K, Kawakami Y, Maru E (Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71:205-216.2003).
- Tu B, Bazan NG (Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex. *Exp Neurol* 179:167-175.2003).
- Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, Kudo I (Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem* 276:34918-34927.2001).
- Ueno N, Takegoshi Y, Kamei D, Kudo I, Murakami M (Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 338:70-76.2005).
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38:97-120.1998).
- Vezzani A, Granata T (Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46:1724-1743.2005).
- Vidensky S, Zhang Y, hand T, Goellner J, Shaffer A, Isakson P, Andreasson K (Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response. *Neuromolecular Med* 3:15-28.2003).
- Visioli F, Rodriguez de Turco EB, Kreisman NR, Bazan NG (Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. *Metab Brain Dis* 9:161-170.1994).
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (Expression of a Mitogen-Inducible Cyclooxygenase in Brain Neurons - Regulation by Synaptic Activity and Glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386.1993).

## Figure legends

Figure 1: (A) Effect of oral administration of increasing doses of celecoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg) on the latency for onset of clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). It is also shown the latency for onset (B) and (C) duration of generalized tonic-clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). Data are median  $\pm$  interquartile ranges for n=10 in each group.

Figure 2: (A) Typical electroencephalographic recording after oral administration of vehicle and (B) typical seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg). RHIP, right hippocampus; RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multispikes ( $\geq 2X$  baseline,  $\geq 3$  spikes/complex) + slow waves; 2: major seizure ( $\geq 5$  s, repetitive spikes); 3: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1$  s  $\geq 5$  s). Calibration bars, 100  $\mu$ V and 1s.

Figure 3: (A) Typical electroencephalographic recording after oral administration of celecoxib (2 mg/kg) and (B) decrease of seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1$  s  $\geq 5$  s). Calibration bars, 100  $\mu$ V and 1s.

Figure 4: (A) Effect of intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> antibodies (4 $\mu$ g/2 $\mu$ l) on the latency for onset of clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). It is also shown the latency for onset (B) and (C)

duration of generalized tonic-clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). Data are median  $\pm$  interquartile ranges for n=12-13 in each group.

Figure 5: (A) Typical electroencephalographic recording after intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> antibodies (4 $\mu$ g/2 $\mu$ l) and (B) decrease of seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg) (C). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1$  s  $\geq 5$  s). Calibration bars, 100  $\mu$ V and 1s.

Figure 6: (A) Typical electroencephalographic recording after intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> (100 $\mu$ g/2 $\mu$ l) and (B) typical seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (20 mg/kg). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), longer spindle episodes ( $> 5$  s); 2: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1$  s  $\geq 5$  s). Calibration bars, 100  $\mu$ V and 1s.

Figure 1

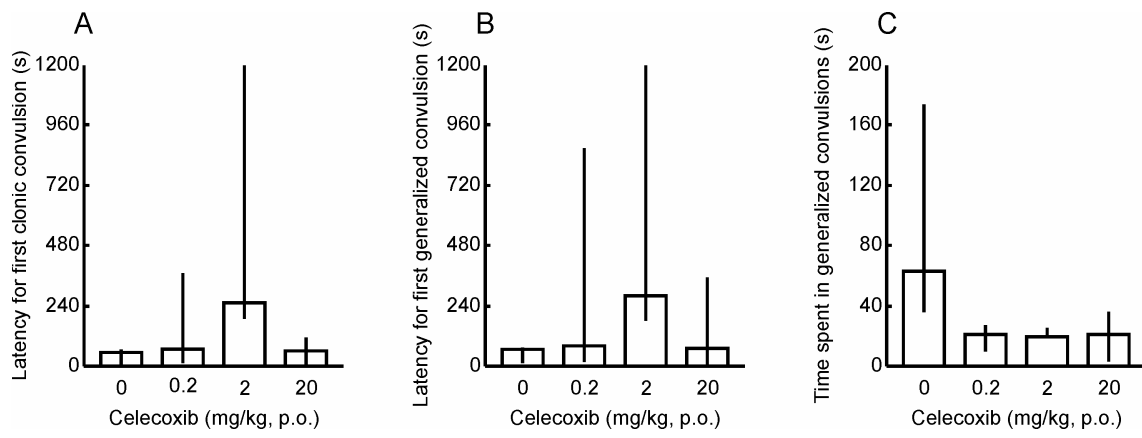


Figure 2

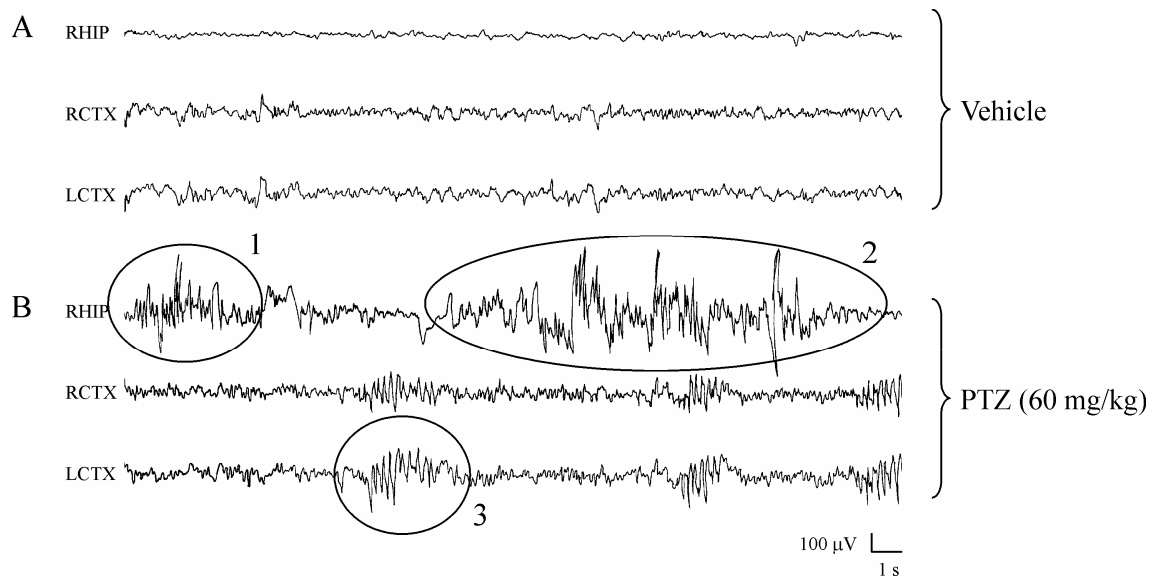




Figure 3

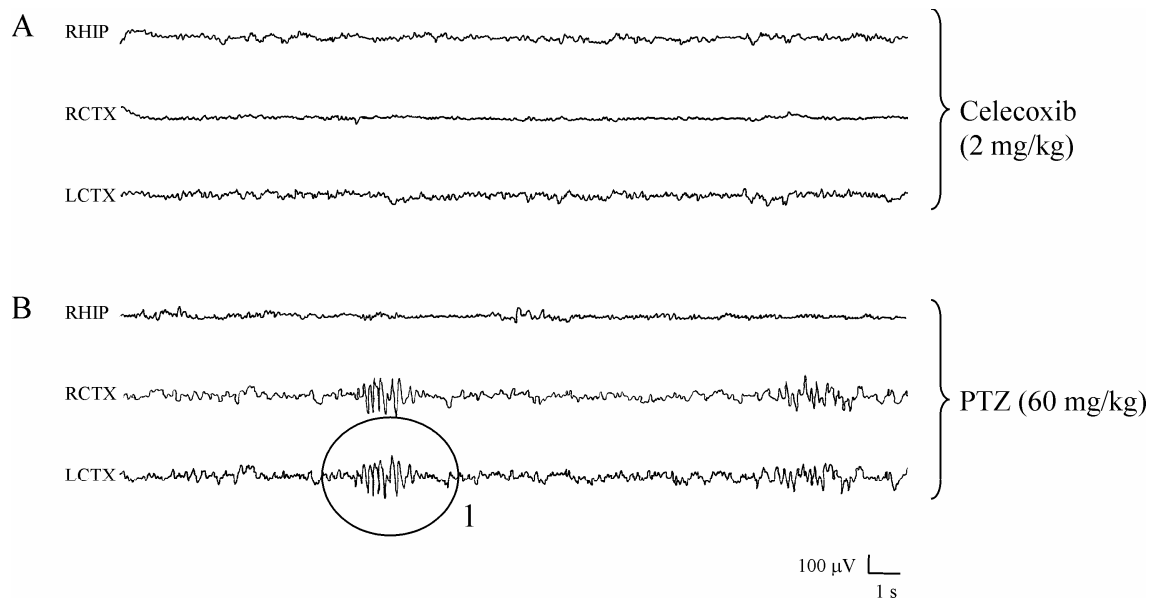


Table 1: Effect of systemic administration of increasing doses of celecoxib on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats.

Treatment 1	Treatment 2	Protein carbonyl content		Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity	
		(nmol carbonyl/mg protein)		(nmol Pi/mg protein/min)	
		Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex
CMC + Tween	Saline	6.87 ± 0.77	8.25 ± 1.19	116.98 ± 7.07	120.23 ± 5.20
Celecoxib 0.2	Saline	6.81 ± 0.57	8.00 ± 1.19	117.41 ± 8.19	124.89 ± 7.95
Celecoxib 2	Saline	7.21 ± 0.54	7.95 ± 0.89	119.72 ± 5.25	115.66 ± 5.85
Celecoxib 20	Saline	7.09 ± 0.64	8.13 ± 0.82	123.34 ± 6.96	121.09 ± 4.45
CMC + Tween	PTZ	8.38 ± 1.43	9.76 ± 1.55	82.16 ± 5.82 *	81.64 ± 6.89 *
Celecoxib 0.2	PTZ	6.68 ± 1.07	6.15 ± 0.69	109.31 ± 5.37 *	99.90 ± 7.28 *
Celecoxib 2	PTZ	6.47 ± 0.61	6.61 ± 0.60	118.26 ± 8.52	122.33 ± 4.93
Celecoxib 20	PTZ	6.61 ± 0.87	6.71 ± 0.71	96.01 ± 11.79 *	100.91 ± 8.68 *

Data mean ± S.E.M. for n=9-11 in each group. \**p*<0.05 compared with CMC + Tween /saline treated group (Student-Newman-Keuls test).

Figure 4

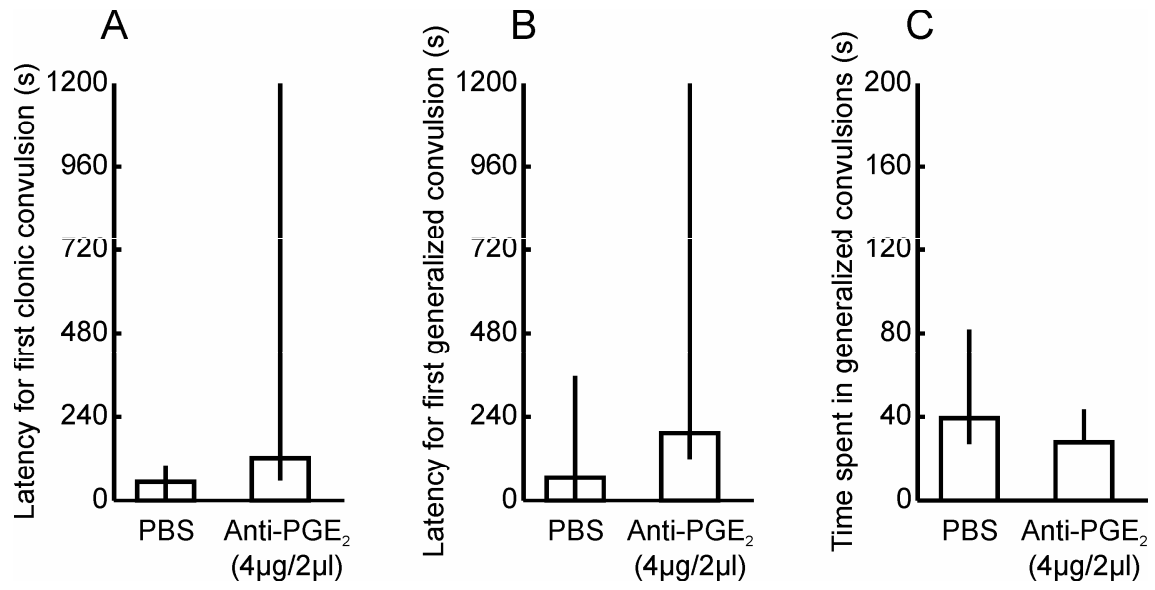


Figure 5

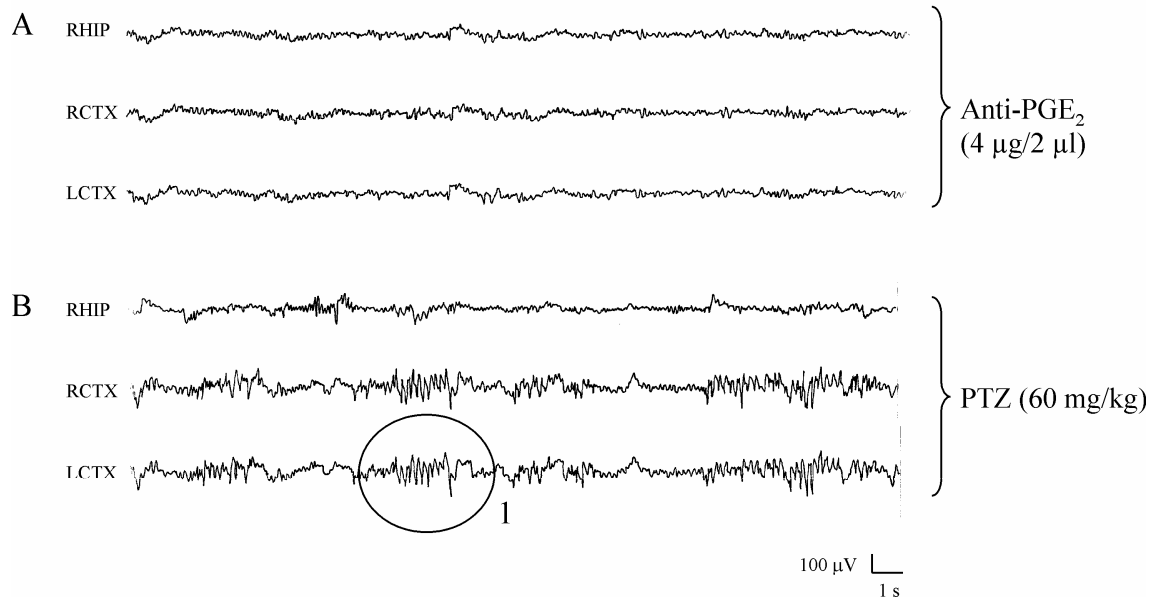


Table 2: Effect of intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats.

Treatment 1	Treatment 2	Protein carbonyl content		Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity	
		(nmol carbonyl/mg protein)		(nmol Pi/mg protein/min)	
		Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex
PBS	Saline	6.89 ± 0.74	8.80 ± 1.41	144.64 ± 7.89	151.87 ± 10.23
Anti-PGE <sub>2</sub>	Saline	6.93 ± 0.55	9.03 ± 0.86	139.55 ± 11.40	151.68 ± 13.53
PBS	PTZ	8.23 ± 0.71	9.09 ± 0.56	107.14 ± 9.65 *	99.41 ± 8.03 *
Anti-PGE <sub>2</sub>	PTZ	8.08 ± 0.40	9.04 ± 0.47	149.80 ± 16.60	144.75 ± 14.02

Data mean ± S.E.M. for n=9–13 in each group. \**p*<0.05 compared with PBS/saline treated group (Student-Newman-Keuls test).

Figure 6

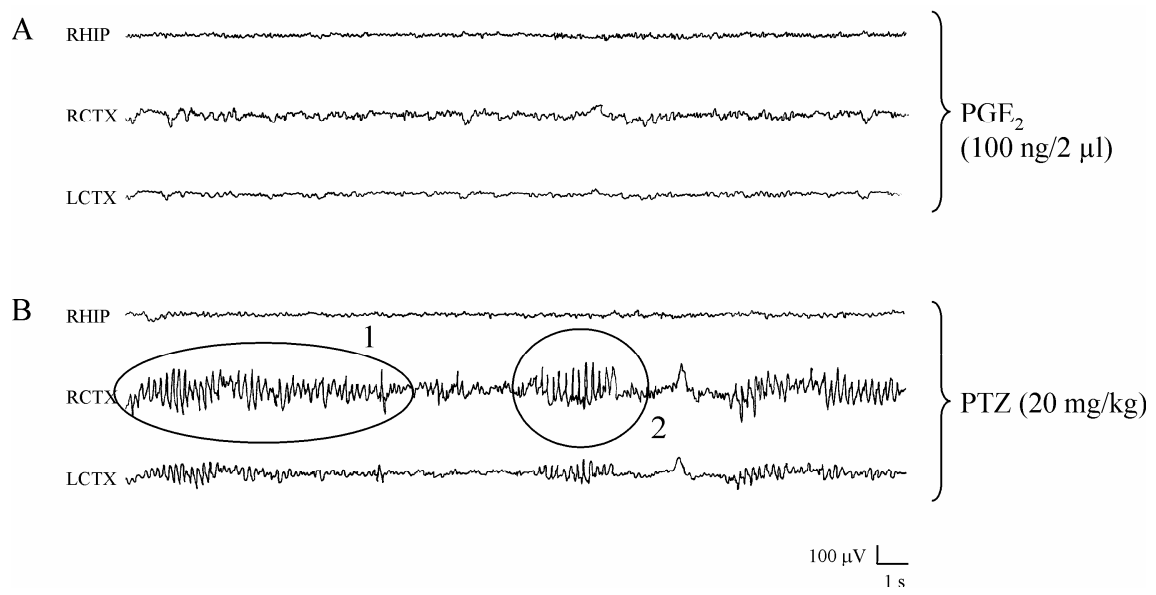


Table 3: Effect of intracerebroventricular administration of increasing doses of PGE<sub>2</sub> on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats.

Treatment 1	Treatment 2	Protein carbonyl content		Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity	
		(nmol carbonyl/mg protein)		(nmol Pi/mg protein/min)	
		Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex
PBS	Saline	6.57 ± 0.34	6.74 ± 1.29	141.29 ± 10.15	144.05 ± 7.62
PGE <sub>2</sub> 1	Saline	7.63 ± 1.03	8.60 ± 1.50	135.35 ± 9.79	138.11 ± 9.97
PGE <sub>2</sub> 10	Saline	7.36 ± 0.35	7.70 ± 0.63	144.64 ± 14.47	158.73 ± 9.63
PGE <sub>2</sub> 100	Saline	6.79 ± 0.26	7.83 ± 0.20	124.56 ± 10.91	141.81 ± 9.61
PBS	PTZ	8.22 ± 0.67	8.47 ± 1.07	123.57 ± 11.43	156.35 ± 20.25
PGE <sub>2</sub> 1	PTZ	6.75 ± 0.31	7.71 ± 0.23	137.66 ± 15.39	154.50 ± 27.45
PGE <sub>2</sub> 10	PTZ	7.71 ± 0.80	7.54 ± 0.85	143.72 ± 14.92	127.95 ± 20.92
PGE <sub>2</sub> 100	PTZ	8.03 ± 0.29	9.07 ± 1.09	123.67 ± 4.10	158.03 ± 18.31

Data mean ± S.E.M. for n=4-7 in each group.

## **CAPÍTULO III**



---

## **4 DISCUSSÃO**

#### 4. Discussão

No presente trabalho nós mostramos que a administração oral de um inibidor seletivo para COX-2, celecoxib, e a administração intracerebroventricular de anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> diminuem as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e a inibição atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ no hipocampo e córtex cerebral de ratos. Além disso, nós mostramos que a administração de PGE<sub>2</sub>, em uma dose que não causa alterações comportamentais e eletroencefalográficas *per se*, induz convulsões eletroencefalográficas quando dada em combinação com uma dose subconvulsivante de PTZ.

Um crescente número de evidências sugere que a COX-2 está envolvida em uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo epilepsia (Vezzani and Granata, 2005). De fato, pacientes com epilepsia do lobo temporal e camundongos geneticamente susceptíveis à convulsões mostram aumento na expressão da COX-2 no cérebro (Okada et al., 2001; Desjardins et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que a expressão da COX-2 aumenta no cérebro durante o desenvolvimento de kindling induzido por estimulação elétrica do hipocampo (Tu and Bazan, 2003) e que camundongos transgênicos que superexpressam a COX-2 são mais susceptíveis às convulsões induzidas por cainato (Kelley et al., 1999), o que pode sugerir que os produtos de sua reação podem facilitar o desenvolvimento de convulsões. De acordo com esta hipótese, o efeito protetor da inibição da COX-2 contra a excitotoxicidade induzida por NMDA *in vitro* e *in vivo* é revertido por um análogo da PGE<sub>2</sub> (Carlson, 2003; Manabe et al., 2004). Especialmente no caso das convulsões induzidas por PTZ é interessante mencionar que a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> está aumentada nos estágios iniciais das convulsões induzidas por PTZ e que os níveis de PGE<sub>2</sub> no cérebro aumentam após a

administração sistêmica de PTZ (Lysz et al., 1987; Visioli et al., 1994). Entretanto, resultados conflitantes têm surgido na literatura considerando o efeito de inibidores seletivos da COX-2 nas convulsões induzidas por PTZ, já que foi mostrado que estes compostos podem ser anticonvulsivantes ou não ter efeito sobre as convulsões induzidas por este antagonista GABAérgico. Enquanto Akarsu et al. (2006) mostrou que o inibidor seletivo da COX-2 SC-58236 (20 ou 40 mg/kg, s.c.) não tem efeito sobre as convulsões induzidas por PTZ, Dhir et al. (2006) mostrou que a administração de inibidores seletivos da COX-2, rofecoxib e nimesulida, aumenta a latência para o aparecimento e diminui a duração das convulsões induzida por PTZ.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os resultados mostrados por Dhir et al. (2006), já que nós mostramos que o celecoxib (2 mg/kg, p.o.) atenuou as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ. Nós encontramos evidências que sugerem um papel importante para COX-2 e seu produto PGE<sub>2</sub> nas convulsões e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ. Três linhas de evidências suportam este achado. A primeira evidência é que a inibição da COX-2 com celecoxib atenua as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ. Em segundo lugar, a administração de anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> também atenua as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ. Por último, a injeção de PGE<sub>2</sub>, em uma dose que não causa alterações comportamentais e eletroencefalográficas *per se*, induz convulsões eletroencefalográficas quando dada em combinação com uma dose subconvulsivante de PTZ.

Estudos recentes têm sugerido que a PGE<sub>2</sub> é um efetor chave na via de sinalização da COX-2 (para uma revisão, ver (Sang and Chen, 2006). De fato, tem sido

demonstrado que o inibidor seletivo da COX-2, NS-398, reduz a excitabilidade das membranas somática e dendrítica em fatias de hipocampo de ratos (Chen and Bazan, 2005). Além disso, a aplicação de PGE<sub>2</sub>, mas não de PGD<sub>2</sub> ou PGF<sub>2α</sub> aumenta a frequência de disparos, amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos em fatias de hipocampo de ratos incubadas com NS-398 (Chen and Bazan, 2005). Mais evidências para um papel importante para PGE<sub>2</sub> no controle da neurotransmissão excitatória no cérebro vem do estudo de Bezzi et al. (1998), que mostrou que a PGE<sub>2</sub> induz liberação de glutamato por astrócitos. Assim, uma diminuição nos níveis de PGE<sub>2</sub> pela administração de celecoxib ou anticorpo anti-PGE<sub>2</sub> poderia diminuir a excitabilidade cerebral e/ou a susceptibilidade ao PTZ.

Outra possibilidade interessante é que não somente uma diminuição nos níveis de PGE<sub>2</sub>, mas também uma razão aumentada PGD<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub> pode contribuir para os efeitos anticonvulsivantes do celecoxib e dos anticorpos anti-PGE<sub>2</sub>, já que tem sido demonstrado que a administração de PGD<sub>2</sub> atenua as convulsões induzidas por PTZ (Bhattacharya and Parmar, 1987; Akarsu et al., 1998). Considerando este ponto de vista, tem sido sugerido que as isoformas da ciclooxigenase estão diferentemente acopladas com prostaglandinas sintases específicas (Ueno et al., 2001; Ueno et al., 2005), sendo que a PGE<sub>2</sub> é produzida preferencialmente após ativação da COX-2 e a PGD<sub>2</sub> após ativação da COX-1. De acordo, a inibição seletiva da COX-2 com NS-398 diminui os níveis cerebrais de PGE<sub>2</sub>, mas não de PGD<sub>2</sub> (Sang et al., 2005). Assim, a inibição da COX-2 com celecoxib ou neutralização da PGE<sub>2</sub> com anticorpos específicos poderia resultar em níveis diminuídos de PGE<sub>2</sub>, mas não de PGD<sub>2</sub>, e diminuir a susceptibilidade ao PTZ. De acordo com esta hipótese, as convulsões induzidas por PTZ são aumentadas por um inibidor seletivo da COX-1 (Akarsu et al., 2006), que diminuem os níveis de PGD<sub>2</sub> mas não de PGE<sub>2</sub>.

Uma outra possibilidade para uma diminuição da excitabilidade cerebral e/ou susceptibilidade às convulsões induzidas por PTZ após inibição da COX-2 pode estar relacionada com transmissão endocanabinóide. Neste contexto, tem sido mostrado que inibidores seletivos da COX-2, meloxicam e NS-398, diminuem os potenciais excitatórios pós-sinápticos em fatias de hipocampo de ratos por mecanismos relacionados ao receptor canabinóide CB1, e não relacionados à transmissão GABAérgica (Slanina and Schweitzer, 2005). Se os efeitos protetores do celecoxib contra as convulsões induzidas por PTZ vistos neste trabalho envolvem uma potencialização da inibição mediada por canabinóides ainda está por ser determinado, mas é interessante mencionar que as convulsões induzidas por PTZ são diminuídas por N-palmitoil-etanolamida, um potencial endocanabinóide (Sheerin et al., 2004).

Neste estudo nós mostramos que a administração sistêmica de PTZ não altera os níveis de proteínas carboniladas no hipocampo e córtex cerebral de ratos vinte minutos após sua administração. Embora em estudos prévios do nosso grupo tenha sido demonstrado um aumento significativo neste marcador de dano oxidativo em proteínas 15 minutos após a injeção intracerebral de PTZ (Oliveira et al., 2004; Ribeiro et al., 2005; Figuera et al., 2006), outros grupos também não encontraram um aumento na carbonilação de proteínas no hipocampo e córtex cerebral de camundongos 15 minutos após a administração sistêmica de PTZ (Patsoukis et al., 2004a; Patsoukis et al., 2004b). Assim, parece que a rota de administração é crítica para demonstração de aumento nos níveis de carbonilação de proteínas induzido por PTZ, embora seja possível que a determinação da carbonilação total de proteínas não revele o dano oxidativo em alvos específicos, que poderiam predispor ao aparecimento de convulsões e corresponder a uma pequena fração do conteúdo de proteínas carboniladas, como por exemplo a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Embora qualquer constituinte celular possa ser alvo para o dano oxidativo provocado por espécies reativas, o dano a alguns alvos específicos poderia aumentar a excitabilidade cerebral e facilitar o aparecimento de convulsões (Patel, 2004). A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um desses alvos porque é responsável por manter os gradientes iônicos através da membrana plasmática, e, de fato, sua inibição causa o aparecimento de convulsões em camundongos (Jamme et al., 1995). De acordo, a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é particularmente sensível ao dano causado por espécies reativas, que alteram a composição da membrana plasmática (Jamme et al., 1995) e o estado de oxidação de grupos sulfidrílicos regulatórios (Morel et al., 1998). Além disso, também é possível que o PTZ possa diminuir a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase através de uma interação direta com a enzima (Dubberke et al., 1998). Assim, considerando a sensibilidade da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ao dano oxidativo e/ou inibição direta pelo PTZ, é plausível que a diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase vista neste estudo possa contribuir para hiperexcitabilidade induzida por PTZ. Dessa maneira a proteção contra inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzida por celecoxib ou anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> poderia resultar em animal menos sensível ao PTZ.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que a via da COX-2/PGE<sub>2</sub> facilita as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzidas por PTZ.

---

## **5 CONCLUSÕES**

## 5. Conclusões

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

1. O inibidor seletivo da COX-2, celecoxib (2 mg/kg, p.o.) atenua as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ (60 mg/kg, i.p.).
2. A administração de anticorpos anti-PGE<sub>2</sub> (4 µg/2 µl, i.c.v.) atenua as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas e a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzidas por PTZ (60 mg/kg, i.p.).
3. A administração de PGE<sub>2</sub> (100 ng/2µl, i.c.v.) não induz convulsões *per se* mas induz convulsões eletroencefalográficas em combinação com uma dose subconvulsivante de PTZ (20 mg/kg, i.p.).



---

## **6 REFERÊNCIAS**

## 6. Referências

- Akarsu ES, Mamuk S, Comert A (1998) Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. *Epilepsy Res* 30:63-68.
- 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.
- 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.
- Bergstrom S, Samuelsson B (1962) Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. 11. *J Biol Chem* 237:3005-3006.
- Bergstrom S, Danielsson H, Samuelsson B (1964) Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins + Related Factors 32. *Biochimica Et Biophysica Acta* 90:207-&.
- 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.
- Bhattacharya SK, Parmar SS (1987) Prostaglandin D2 inhibits pentylentetrazole-induced convulsions in rats by a serotonin-mediated mechanism. *Pharm Res* 4:406-408.
- Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V (2005) Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76:1-18.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

- Bosetti F, Langenbach R, Weerasinghe GR (2004) 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 Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A2. *J Neurochem* 91:1389-1397.
- Boulant JA, Chow AR, Griffin JD (1997) Determinants of hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 813:133-138.
- Candelario-Jalil E, Alvarez D, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Martinez-Sanchez G, Merino N, Giuliani A, Leon OS (2002) Neuroprotective efficacy of nimesulide against hippocampal neuronal damage following transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol* 453:189-195.
- Carlson NG (2003) Neuroprotection of cultured cortical neurons mediated by the cyclooxygenase-2 inhibitor APHS can be reversed by a prostanoid. *J Neurosci Res* 71:79-88.
- Cernak I, O'Connor C, Vink R (2001) Activation of cyclo-oxygenase-2 contributes to motor and cognitive dysfunction following diffuse traumatic brain injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:922-925.
- Cernak I, O'Connor C, Vink R (2002) Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res* 147:193-199.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13926-13931.

- Chen C, Bazan NG (2005) Endogenous PGE<sub>2</sub> regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93:929-941.
- Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH (1995) Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuroreport* 6:245-248.
- Collaco-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, de Belleruche J (1996) Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1366-1372.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003a) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9:169-176.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003b) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23-38.
- Dash PK, Mach SA, Moore AN (2000) Regional expression and role of cyclooxygenase-2 following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17:69-81.
- Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yanez JA (2004) Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci* 7:217-226.
- 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.
- DeWitt DL, Smith WL (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1412-1416.

- Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK (2006) Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1478-1485.
- Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, Hurn PD, Traystman RJ, Andreasson K (2003) Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann Neurol* 54:155-162.
- Dubberke R, Vasilets LA, Schwarz W (1998) Inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump by the epileptogenic pentylenetetrazole. *Pflugers Arch* 437:79-85.
- Faden AI, Salzman S (1992) Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci* 13:29-35.
- Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC, Mello CF (2006) GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol Dis* 22:611-623.
- Furian AF, Figuera MR, Oliveira MS, Ferreira AP, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, Royes LF (2006) Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int*.
- Gerozissis K, De Saint Hilaire Z, Orosco M, Rouch C, Nicolaidis S (1995) Changes in hypothalamic prostaglandin E2 may predict the occurrence of sleep or wakefulness as assessed by parallel EEG and microdialysis in the rat. *Brain Res* 689:239-244.
- Goldblatt MW (1935) Properties of human seminal plasma. *J Physiol* 84:208-218.
- Gopez JJ, Yue H, Vasudevan R, Malik AS, Fogelsanger LN, Lewis S, Panikashvili D, Shohami E, Jansen SA, Narayan RK, Strauss KI (2005) Cyclooxygenase-2-

specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* 56:590-604.

Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escueta AV (1992) Contribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res* 12:141-149.

Gupta RA, Dubois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1:11-21.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.

Hayaishi O, Matsumura H (1995) Prostaglandins and sleep. *Adv Neuroimmunol* 5:211-216.

Hemler M, Lands WE (1976) Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 251:5575-5579.

Iadecola C, Forster C, Nogawa S, Clark HB, Ross ME (1999) Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 98:9-14.

Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME (2001) Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1294-1299.

Ivanov AI, Romanovsky AA (2004) Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 9:1977-1993.

- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (1995) Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333-337.
- Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 65:817-849.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK (2006) Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 23:237-246.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2317-2321.
- Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA, Kunz A, Cho S, Orio M, Iadecola C (2006) Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 12:225-229.
- 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 DK, Jang TJ (2006) Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure. *Int J Exp Pathol* 87:73-78.
- Kim J, Alger BE (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7:697-698.
- Kis B, Snipes JA, Busija DW (2005) Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1-7.

- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384:644-648.
- Kurzrok R, Lieb C (1930) Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 28:268.
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32:790-796.
- Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 99:15-24.
- Lysz TW, Centra M, Markey K, Keeting PE (1987) Evidence for increased activity of mouse brain fatty acid cyclooxygenase following drug-induced convulsions. *Brain Res* 408:6-12.
- Manabe Y, Anrather J, Kawano T, Niwa K, Zhou P, Ross ME, Iadecola C (2004) Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity. *Ann Neurol* 55:668-675.
- Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P (1988) Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem* 263:3550-3553.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Narhi M, Hokfelt T, Koistinaho J (1997) Spreading depression and focal brain ischemia



- induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6500-6505.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 251:2629-2636.
- Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F (1998) Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 33:531-540.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-2755.
- Okada K, Yuhi T, Tsuji S, Yamashita U (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. *Brain Res* 894:332-335.
- Oliveira MS, Furian AF, Royes LFF, Figuera MR, Myskiw JD, Fiorenza NG, Mello CF (2004) Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728.
- Patel M (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37:1951-1962.
- Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML (2005) New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Research Reviews* 48:352-359.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA, Panagopoulos NT (2004a) Effect of pentylentetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. *Epilepsy Res* 62:65-74.

- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (2004b) Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357:83-86.
- Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL (2006) *Models of seizures and epilepsy*. San Diego: Academic Press.
- Rall JM, Mach SA, Dash PK (2003) Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res* 968:273-276.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF (2005) alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66:185-194.
- Rome LH, Lands WE (1975) Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:4863-4865.
- Sairanen T, Ristimäki A, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Kaste M, Lindsberg PJ (1998) Cyclooxygenase-2 is induced globally in infarcted human brain. *Ann Neurol* 43:738-747.
- Samuelsson B (1964) Identification of a Smooth Muscle-Stimulating Factor in Bovine Brain. *Prostaglandins and Related Factors* 25. *Biochim Biophys Acta* 84:218-219.
- Sang N, Chen C (2006) Lipid signaling and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 12:425-434.

- Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C (2005) Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* 25:9858-9870.
- Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME (2004) Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia* 45:1184-1188.
- Simmons D, Xie W, Chipman J, Evett G (1991) Multiple cyclooxygenases: Cloning of an inducible form. In: *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins and PAF* (Bailey J, ed), pp 67-78. New York: Plenum Press.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* 56:387-437.
- Slanina KA, Schweitzer P (2005) Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology* 49:653-659.
- Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P (2005) Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* 49:660-668.
- Smith WL, Lands WE (1972) Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 11:3276-3285.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182.
- Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, Branco LG (2002) Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res* 944:135-145.

- Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, Raghupathi R, Mehta S, Narayan RK (2000) Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 17:695-711.
- Teather LA, Packard MG, Bazan NG (2002) Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem* 9:41-47.
- Tu B, Bazan NG (2003) Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex. *Exp Neurol* 179:167-175.
- 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.
- 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.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Vezzani A, Granata T (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46:1724-1743.
- Vidensky S, Zhang Y, Hand T, Goellner J, Shaffer A, Isakson P, Andreasson K (2003) Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response. *Neuromolecular Med* 3:15-28.
- Visioli F, Rodriguez de Turco EB, Kreisman NR, Bazan NG (1994) Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. *Metab Brain Dis* 9:161-170.

- von Euler US (1936) On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* 88:213-234.
- Warner TD, Mitchell JA (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* 18:790-804.
- 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.
- Yokoyama C, Takai T, Tanabe T (1988) Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 231:347-351.

---

## **7 ANEXOS**

## 7.1 Lista de Figuras

### 7.1.1. Capítulo I

Figura 1: Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub>.

Fonte: adaptado de Gupta and Dubois, 2001.

### 7.1.2. Capítulo II

Figure 1: (A) Effect of oral administration of increasing doses of celecoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg) on the latency for onset of clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). It is also shown the latency for onset (B) and (C) duration of generalized tonic-clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). Data are median  $\pm$  interquartile ranges for n=10 in each group.

Figure 2: (A) Typical electroencephalographic recording after oral administration of vehicle and (B) typical seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg). RHIP, right hippocampus; RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multispikes ( $\geq 2X$  baseline,  $\geq 3$  spikes/complex) + slow waves; 2: major seizure ( $\geq 5$  s, repetitive spikes); 3: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1$  s  $\geq 5$  s). Calibration bars, 100  $\mu$ V and 1s.

Figure 3: (A) Typical electroencephalographic recording after oral administration of celecoxib (2 mg/kg) and (B) decrease of seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple

sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1\text{ s} \geq 5\text{ s}$ ). Calibration bars, 100  $\mu\text{V}$  and 1s.

Figure 4: (A) Effect of intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> antibodies (4 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) on the latency for onset of clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). It is also shown the latency for onset (B) and (C) duration of generalized tonic-clonic convulsions elicited by systemic administration of PTZ (60 mg/kg). Data are median  $\pm$  interquartile ranges for n=12-13 in each group.

Figure 5: (A) Typical electroencephalographic recording after intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> antibodies (4 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) and (B) decrease of seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (60 mg/kg) (C). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1\text{ s} \geq 5\text{ s}$ ). Calibration bars, 100  $\mu\text{V}$  and 1s.

Figure 6: (A) Typical electroencephalographic recording after intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> (100 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) and (B) typical seizure sequences observed after systemic administration of PTZ (20 mg/kg). RCTX, right cortex; LCTX, left cortex. 1: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), longer spindle episodes ( $> 5\text{ s}$ ); 2: multiple sharp waves ( $\geq 2X$  baseline), brief spindle episodes ( $\geq 1\text{ s} \geq 5\text{ s}$ ). Calibration bars, 100  $\mu\text{V}$  and 1s.



## 7.2. Lista de Tabelas

### 7.2.1. Capítulo I

Tabela 1: Principais diferenças entre as isoformas de ciclooxigenase.

Fonte: compilado de Simmons et al., 2004; Smith et al., 2000; Vane et al., 1998.

Tabela 2: Tipos e subtipos de receptores EP e respectivas cascatas de sinalização.

Fonte: adaptado de Narumiya, et al., 1999.

### 7.2.2. Capítulo III

Table 1: Effect of systemic administration of increasing doses of celecoxib on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats. Data mean ± S.E.M. for n=9-11 in each group. \**p*<0.05 compared with CMC + Tween/saline treated group (Student-Newman-Keuls test).

Table 2: Effect of intracerebroventricular administration of PGE<sub>2</sub> monoclonal antibodies on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats. Data mean ± S.E.M. for n=9-13 in each group. \**p*<0.05 compared with PBS/saline treated group (Student-Newman-Keuls test).

Table 3: Effect of intracerebroventricular administration of increasing doses of PGE<sub>2</sub> on the PTZ-elicited protein carbonyl content and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus and cortex from rats. Data mean ± S.E.M. for n=4-7 in each group.

### 7.3. Trabalhos desenvolvidos no período não relacionados a presente dissertação de mestrado

- Alpha-tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. RIBEIRO, Marinei Cristina Pereira; ÁVILA, Daiana Silva de; SCHNEIDER, Carmen Matiauda; HERMES, Fernando Sthal; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; RUBIN, Maribel Antonello; LEHMANN, Martina; KRIEGLSTEIN, Josef; MELLO, Carlos Fernando de. *Epilepsy Resarch* (ISSN/ISBN: 0920-1211), v. 66, n. 1-3, p. 185-194, 2005.

- GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentilenotetrazol. FIGHERA, Michele Rechia; ROYES, Luiz Fernando Freire; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; FRUSSA FILHO, Roberto; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. *Neurobiology of Disease* (ISSN/ISBN: 09699961), v. 22, p. 611-623, 2006.

- Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. ROYES, Luiz Fernando Freire; FIGHERA, Michele Rechia; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; MYSKIW, Jociane de Carvalho; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (ISSN/ISBN: 00913057), v. 83, p. 136-144, 2006.

- Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. FURIAN, Ana Flávia; FIGHERA, Michele Rechia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FERREIRA, Ana Paula de Oliveira; FIORENZA, Natália Gindri; MYSKIW, Jociane de Carvalho; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de; ROYES, Luiz Fernando Freire. *Neurochemistry International* (ISSN/ISBN: 0197-0186), v. p. in press, 2006.

- The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. ROYES, Luiz Fernando Freire; FIGHERA, Michele Rechia; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. Epilepsy Research (ISSN/ISBN: 0920-1211), v., n., p. in press, 2006.