

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

**O PAPEL DOS RECEPTORES PARA PROSTAGLANDINA
E₂ NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL**

MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

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

**O PAPEL DOS RECEPTORES PARA PROSTAGLANDINA
E₂ NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL**

MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Tese 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 Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

*“O saber é saber que nada se sabe.
Esta é a definição do verdadeiro conhecimento”.*
Confúcio (551 - 479 a.c.), filósofo chinês

Esta tese é dedicada aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Ney, que sempre fizeram de seus filhos a 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 professores e amigos Luiz Fernando Royes e Juliano Ferreira, muito obrigado pelo apoio e pelas importantes sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e alunos Leonardo Rambo e Leandro Ribeiro, muito obrigado pela disposição e dedicação indispensáveis para realização deste trabalho.

Ao professor e amigo Emilio Garrido-Sanabria, pelo apoio durante o estágio no exterior e por compartilhar seus conhecimentos de maneira entusiasmante.

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

Agradeço ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Agradeço a International Brain Research Organization pela oportunidade de participar de seus cursos de aperfeiçoamento e pelo apoio financeiro recebido.

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. Receptores para PGE ₂	14
1.3.1. Estrutura molecular dos receptores EP.....	14
1.3.2. Vias de sinalização ativadas por receptores EP.....	15
1.3.3. Distribuição e localização celular dos receptores EP no cérebro.....	17
1.4. Papel fisiológico dos receptores EP no cérebro.....	17
1.4.1. Ciclo sono/vigília.....	18
1.4.2. Termoregulação e febre.....	19
1.5. Papel patológico da COX-2 e da PGE ₂ no cérebro.....	19
1.5.1. Isquemia.....	20
1.5.2. Convulsões e epilepsia	21
1.6. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	23
1.6.1. Aspectos estruturais da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	24
1.6.2. Regulação da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	26
1.6.3. Aspectos fisiológicos e patológicos da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase no cérebro.....	27
2. Objetivo.....	29
2.1 Hipóteses.....	30

Capítulo II

3. Artigos científicos.....	33
-----------------------------	----

Capítulo III

4. Discussão.....	55
5. Conclusões.....	65
5.1 Conclusões parciais.....	66
5.2 Conclusão geral.....	67
6. Perspectivas.....	68
7. Referências.....	70

CAPÍTULO I

RESUMO

A prostaglandina E_2 (PGE_2) é quantitativamente a principal prostaglandina produzida no cérebro de mamíferos, e existem evidências que ela facilita as convulsões induzidas por pentilenetetrazol (PTZ). Contudo, o papel dos receptores para PGE_2 (EPs) no desenvolvimento de convulsões ainda não é conhecido, tampouco os mecanismos moleculares envolvidos na facilitação das convulsões por estes agentes. No presente trabalho investigamos se ligantes seletivos de receptores EP alteram as convulsões comportamentais e eletrográficas induzidas por PTZ em ratos Wistar adultos. Antagonistas seletivos dos receptores EP1 (SC-19220, 10 nmol, i.c.v.), EP3 (L-826266, 1 nmol, i.c.v.) e EP4 (L-161982, 750 pmol, i.c.v.), e o agonista seletivo de receptores EP2 (butaprost 100 pmol, i.c.v.) aumentaram a latência para as convulsões clônicas e tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ. Em conjunto, estes dados constituem evidência farmacológica do envolvimento dos receptores EP na indução e/ou manutenção das convulsões induzidas por PTZ. Considerando que níveis aumentados de PGE_2 e diminuição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase são achados comuns em diversas condições excitotóxicas, incluindo convulsões, também investigamos se estes eventos estão relacionados. A hipótese testada foi de que a PGE_2 diminui a atividade da Na^+,K^+ -ATPase no hipocampo de ratos. Os resultados obtidos mostraram que a incubação de fatias de hipocampo de ratos com PGE_2 (0.1–10 μ M) por 30 minutos diminui a atividade da Na^+,K^+ -ATPase de maneira dependente de concentração. O efeito inibitório da PGE_2 não ocorreu em homogeneizados de hipocampo, sugerindo que a integridade celular é necessária para que tal efeito ocorra. O efeito inibitório da PGE_2 sobre a Na^+,K^+ -ATPase não se mostrou relacionado com alterações no conteúdo da subunidade α na membrana plasmática, ou total. O efeito inibitório da PGE_2 (1 μ M) sobre a atividade da Na^+,K^+ -ATPase foi prevenido pela incubação com antagonistas seletivos dos receptores EP1 (SC-19220, 10 μ M), EP3 (L-826266, 1 μ M) e EP4 (L-161982, 1 μ M). Por outro lado, a incubação com um agonista seletivo de receptores EP2 (butaprost 0.1–10 μ M) aumentou a atividade da enzima de maneira dependente de concentração, mas não preveniu o efeito inibitório da PGE_2 . A incubação das fatias de hipocampo com inibidores da proteína cinase A (PKA; H-89, 1 μ M) e proteína cinase C (PKC; GF-109203X, 300 nM) preveniram a diminuição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase induzida por PGE_2 , sugerindo o envolvimento destas proteínas cinases na diminuição da atividade ATPásica. Além disso, a incubação com PGE_2 aumentou a fosforilação do resíduo de serina 943 da subunidade α , um resíduo crucial para a regulação da atividade desta enzima. A diminuição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase por PGE_2 também foi observada in vivo, implicando este evento como um possível mecanismo pelo qual aumenta a excitabilidade cerebral em condições inflamatórias. Mais do que isso, ele pode se constituir no mecanismo molecular pelo qual os receptores EP facilitam as convulsões induzidas por PTZ e, provavelmente, por outros agentes convulsivantes. Embora mais estudos sejam necessários para determinar o potencial anticonvulsivante dos ligantes de receptores EP, estes receptores podem se constituir em um novo alvo para o desenvolvimento de agentes anticonvulsivantes.

ABSTRACT

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is quantitatively one of the major prostaglandins synthesized in mammalian brain, and there is evidence that it facilitates pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures. However, the role of PGE₂ receptors (EPs) in the development of seizures has not been evaluated to date. In the current study we investigated whether selective EP ligands alter PTZ-induced seizures in adult male Wistar rats by electrographic methods. Selective antagonists for EP1 (SC-19220, 10 nmol, i.c.v.), EP3 (L-826266, 1 nmol, i.c.v.) and EP4 (L-161982, 750 pmol, i.c.v.) receptors, and the selective EP2 agonist butaprost (100 pmol, i.c.v.) increased the latency for clonic and generalized tonic-clonic seizures induced by PTZ. These data constitute pharmacological evidence supporting a role for EPs in the seizures induced by PTZ. Considering that both increased brain PGE₂ levels and decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity are common findings in excitotoxic conditions, we decided to investigate whether these biological events are related. It was hypothesized that PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. It was found that incubation of adult rat hippocampal slices with PGE₂ (0.1–10 μM, for 30 min) decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in a concentration-dependent manner. However, PGE₂ did not alter Na⁺,K⁺-ATPase activity if added to hippocampal homogenates. The inhibitory effect of PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity was not related to a decrease in the total or plasma membrane immuncontent of the catalytic α subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. We found that the inhibitory effect of PGE₂ (1 μM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity was receptor-mediated, as incubation with selective antagonists for EP1 (SC-19220, 10 μM), EP3 (L-826266, 1 μM) or EP4 (L-161982, 1 μM) receptors prevented the PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. On the other hand, incubation with the selective EP2 agonist (butaprost, 0.1–10 μM) increased enzyme activity per se in a concentration-dependent manner, but did not prevent the inhibitory effect of PGE₂. Incubation with a protein kinase A (PKA) inhibitor (H-89, 1 μM) and a protein kinase C (PKC) inhibitor (GF-109203X, 300 nM) also prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. Accordingly, PGE₂ increased phosphorylation of Ser943 at the α subunit, a critical residue for regulation of enzyme activity. Importantly, we also found that PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in vivo. Our results imply Na⁺,K⁺-ATPase as a target for PGE₂-mediated signaling, which may underlie PGE₂-induced increase of brain excitability and modulation of PTZ-induced seizures. Although more studies are necessary to fully evaluate the anticonvulsant role these compounds and their use in the clinics, EP receptors may represent new targets for drug development for convulsive disorders.

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

EP₁ - receptor para prostaglandina E₂, tipo 1

EP₂ - receptor para prostaglandina E₂, tipo 2

EP₃ - receptor para prostaglandina E₂, tipo 3

EP₄ - receptor para prostaglandina E₂, 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

PGD₂ - prostaglandina D₂

PGE₂ - prostaglandina E₂

PGF_{2α} - prostaglandina F_{2α}

PGG₂ - prostaglandina G₂

PGH₂ - prostaglandina H₂

PGI₂ - prostaglandina I₂

PKA – proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PLA₂ - fosfolipase A₂

PLC - fosfolipase C

PTZ - pentilenotetrazol

TXA₂ - tromboxano A₂

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). Por volta de 1960 descobriu-se que a “prostaglandina” descrita por von Euler era, na verdade, uma família de substâncias com estrutura química semelhante, os eicosanóides. Mais tarde as primeiras estruturas químicas dos membros desta família começaram a ser elucidadas, sendo descritas as 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

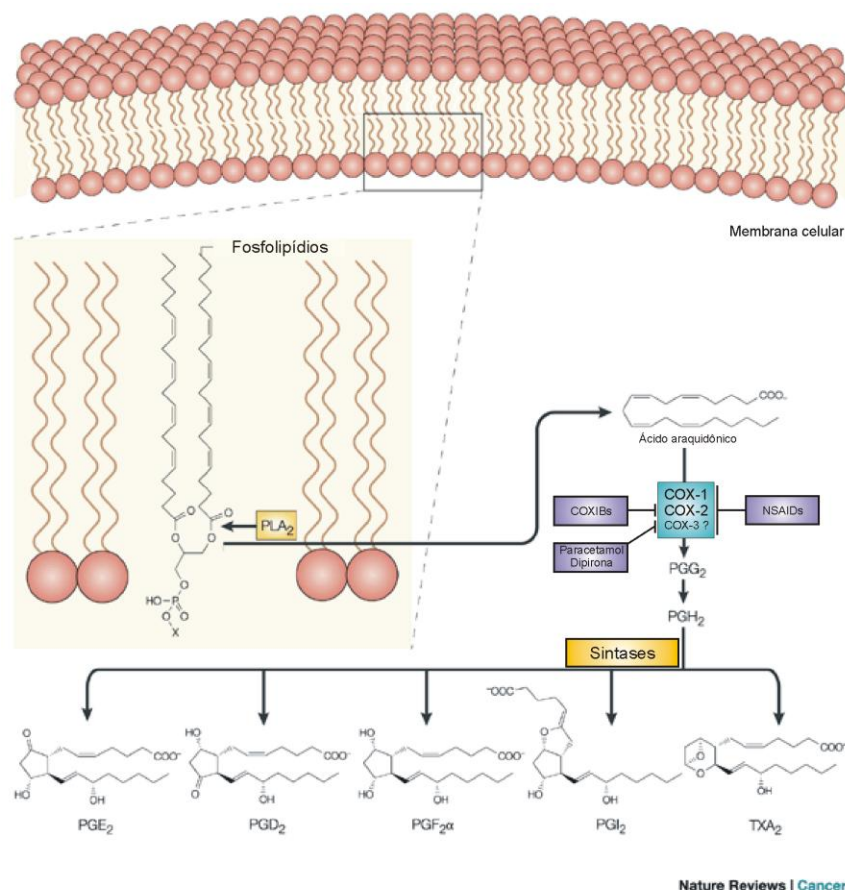
ciclooxigenases, lipoxigenases ou enzimas do sistema do citocromo P450 para formação de eicosanóides (Simmons et al., 2004).

A ciclooxigenase (COX) (E.C. 1.14.99.1), também chamada de prostaglandina H₂ sintase (PGHS), foi identificada como a principal enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em PGH₂ em 1972 (Smith and Lands, 1972), sendo purificada em 1976 a partir de vesículas seminais de ovelha (Hemler and Lands, 1976; Miyamoto et al., 1976). Embora a velocidade de síntese de PGH₂ 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 ciclooxigenase 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 G₂ (PGG₂).

b) Atividade de peroxidase: catalisa a peroxidação do PGG₂ até o hidroxiperóxido prostaglandina H₂ (PGH₂).

A PGH₂ é quimicamente instável e é rapidamente convertida por sintases específicas em uma série de prostaglandinas e tromboxanos, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) e o tromboxano A₂ (TXA₂) (Figura 1).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1: Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A₂. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). No passo seguinte, a ciclooxygenase catalisa a formação PGG₂ e, em seguida, a redução desta a PGH₂. A PGH₂ é subsequentemente convertida em uma série de prostaglandinas, incluindo PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxano A₂ (TXA₂), pela atividade de sintases específicas. Duas isoformas de ciclooxygenase (COX-1 e COX-2) estão caracterizadas em mamíferos. 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) que seria um alvo preferencial para drogas analgésicas/antipiréticas como o paracetamol e dipirona foi proposta.

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 em mamíferos, denominadas COX-1 e COX-2. Ambas são alvos para ação dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (Simmons et al., 2004). Neste sentido, cabe destacar o trabalho seminal do inglês John Vane que descobriu, ainda na década de setenta, que a inibição da ciclooxigenase é o principal mecanismo de ação dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais. A importância e ineditismo desta descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, em 1982.

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 sequência primária, e que catalisam essencialmente a mesma reação de formação da PGH₂. Embora a COX-1 e COX-2 sejam similares em alguns aspectos, existem diferenças importantes que estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1:

Parâmetro	COX-1	COX-2
Peso molecular (kDa)	71	71
Número de aminoácidos	576	587
Localização	MP	MP, MN, MRE
Aminoácido no bolso catalítico	Ile 523/Ile 434/His 513	Val 523/Val 434/Arg 513
Substratos	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato Ácido eicosapentanóico 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) e 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 derivada de modificação pós-transcricional (“splicing”) da COX-1 foi descoberta há aproximadamente sete anos, e chamada COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002). Esta enzima é expressa principalmente no sistema nervoso central, e parece ser seletivamente inibida por alguns fármacos analgésicos/antipiréticos, como paracetamol e dipirona. Assim, a inibição da COX-3 no cérebro poderia representar um mecanismo central primário pelo qual estes fármacos que possuem atividade antiinflamatória quase nula causariam analgesia e diminuiriam a febre (Chandrasekharan et al., 2002). Contudo, ainda há 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).

A 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 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 ciclooxigenase (Patrignani et al., 2005). Contudo, este tema ainda constitui um motivo de significativo debate 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™, Pfizer), que está aprovado pela Food and Drug Administration para o tratamento de várias condições inflamatórias, incluindo osteoartrite, artrite reumatóide e dor aguda. Entretanto, duas tentativas clínicas envolvendo um grande número de pacientes levantaram muitas preocupações com respeito ao perfil de segurança dos inibidores seletivos de COX-2 (Topol and Falk, 2004). Em particular, a administração de rofecoxib foi associada com um aumento de 5 vezes no risco de infarto do miocárdio em comparação com o inibidor não seletivo da COX naproxeno (Topol and Falk, 2004). Este fato resultou na retirada voluntária pela Merck do Vioxx® do Mercado em setembro de 2004. Assim, o perfil de segurança dos inibidores seletivos de COX-2 permanece motivo de debate na literatura.

Apesar da grande importância do aumento da 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 rim e cérebro (Yamagata et al., 1993; Sang and Chen, 2006), onde desempenham papéis importantes na regulação funcional destes órgãos.

1.2. COX-2 e prostaglandinas no cérebro

A presença de prostaglandinas no cérebro foi demonstrada pela primeira vez em 1964 por Samuelsson, outro laureado com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1982 por suas descobertas sobre o papel biológico das prostaglandinas (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 que estes são aumentados pela estimulação de alta frequência que induz a potencialização de longa duração (Yamagata et al., 1993).

A COX-2 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 PGE₂ sintase, já que esta enzima está co-localizada com a COX-2 (Bosetti et al., 2004). Como consequência, a maior parte do PGH₂ produzido na reação da COX-2 é

rapidamente convertido em PGE₂, e esta é quantitativamente a principal prostaglandina produzida no cérebro após ativação da COX-2 (Vidensky et al., 2003; Sang et al., 2005). Tal acoplamento implica a PGE₂ como um efetor chave na via de sinalização da COX-2 no sistema nervoso central, tornando difícil uma dissociação entre as funções mediadas pela COX-2 e por esta prostaglandina (Sang and Chen, 2006).

1.3. Receptores para PGE₂

Acredita-se que a maioria das ações mediadas pela PGE₂ sejam exercidas após ativação de um de seus receptores cognatos, que foram denominados receptores EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007). Estudos de clonagem de cDNA mostraram que todos os receptores EP possuem a arquitetura de sete domínios transmembrana característica de receptores acoplados à proteína G, embora cada um deles seja codificado por um gene distinto (Ptger1, Ptger2, Ptger3 e Ptger4), e promovam respostas celulares pela ativação de diferentes tipos de proteína G.

1.3.1. Estrutura molecular dos receptores EP

Os receptores EP de ratos foram clonados em 1997 por Boie e colaboradores (1997). Os receptores EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ de ratos possuem 405, 357, 366 e 488 aminoácidos, respectivamente. O receptor EP₄ tem o domínio carboxiterminal mais longo entre todos os receptores EP, e a terceira alça intracelular também é relativamente longa. O receptor EP₁ também possui uma terceira alça intracelular grande, enquanto que os receptores EP₂ e EP₃ possuem uma estrutura mais compacta. Um ponto a ser destacado, considerando a estrutura dos receptores EP, é a existência de múltiplas

variantes do receptor EP3, que foram denominadas EP3A, EP3B, EP3C e EP3D. Essas variantes são geradas por processamento alternativo do RNA (“splicing” alternativo) da porção carboxiterminal, e resultam em diferenças cruciais nas vias de sinalização ativadas por cada uma dessas isoformas do receptor EP3, embora apresentem afinidade semelhante pela PGE₂.

Embora todos os receptores EP sejam ativados por PGE₂, a semelhança entre as sequências primárias de aminoácidos dos receptores EP é limitada (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007). A semelhança encontrada entre o receptor EP1 e os receptores EP2, EP3 e EP4 é apenas de 30, 33 e 28 %, respectivamente. Mesmo os receptores EP2 e EP4, que estão acoplados a um mesmo tipo de proteína G, possuem somente 31% de identidade na sequência primária. De fato, o receptor EP2 é mais parecido com os receptores para prostaciclina (IP) e PGD₂ do subtipo 1 (DP1) do que com os outros receptores EP, considerando-se a sequência primária de aminoácidos. A baixa identidade encontrada entre os receptores EP é provavelmente reflexo da relação filogenética dos receptores EP (Katoh et al., 1995).

1.3.2. Vias de sinalização ativadas por receptores EP

Estudos de caracterização farmacológica mostraram que os receptores EP promovem respostas celulares através da ativação de diferentes tipos de proteína G. O receptor EP1 promove o aumento da concentração intracelular de cálcio ([Ca²⁺]_i) (Katoh et al., 1995). Interessantemente, este aumento ocorre sem mudanças detectáveis no metabolismo de fosfatidil-inositol, sugerindo que o receptor EP1 regula a [Ca²⁺]_i via ativação de uma proteína G ainda não identificada (Katoh et al., 1995). Neste sentido, um estudo recente mostrou que receptores EP1 expressos em ovócitos de

Xenopus laevis estão funcionalmente acoplados ao receptor de potencial transitório TRP5, um canal iônico permeável ao Ca^{2+} , e que este acoplamento é inibido pelo oligonucleotídeo complementar (“antisense”) do RNA que codifica a proteína Gq/G11, mas não a proteína Gi (Tabata et al., 2002).

Os receptores EP2 e EP4 estão acoplados à proteína Gs, e promovem aumento na concentração intracelular de AMPc, embora o receptor EP4 também esteja acoplado a ativação da enzima fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K) via proteína Gi (Narumiya et al., 1999; Fujino and Regan, 2003; Sugimoto and Narumiya, 2007). No caso do receptor EP3, a variante EP3A está acoplada à proteína Gi, enquanto as outras variantes acoplam a várias proteínas G (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007). As cascatas de sinalização ativadas pelos receptores EP são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2:

Tipo	Subtipo	Proteína G	Cascata de sinalização
EP ₁	-	Gq/G11?	PLC; ↑ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ↑ PKC
EP ₂	-	Gs	AC; ↑ AMPc
EP ₃	EP _{3A}	Gi	AC; ↓ AMPc
	EP _{3B}	Gs	AC; ↑ AMPc
	EP _{3C}	Gs	AC; ↑ AMPc
	EP _{3D}	Gs	AC; ↑ AMPc
EP ₄	-	Gi	AC; ↓ AMPc
	-	Gq	PLC; ↑ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ↑ PKC
	-	Gs	AC; ↑ AMPc
	-	Gi	AC; ↓ AMPc e ↑ PI3-K

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; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, concentração intracelular de íons cálcio; PKC, proteína quinase C; AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; PI3-K, fosfatidil-inositol-3-quinase.

Fonte: adaptado de Narumiya et al. (1999) e Sugimoto e Narumiya (2007).

1.3.3. Distribuição e localização celular dos receptores EP no cérebro

Os receptores EP são encontrados em diversos tecidos do organismo de mamíferos, incluindo o cérebro. De especial interesse é o fato que todos os receptores EP são expressos no hipocampo, uma área cerebral importante para vários processos fisiológicos e patológicos. O padrão de expressão dos receptores EP no hipocampo foi analisado sistematicamente em um estudo de Zhu et al. (2005), que utilizaram uma combinação de técnicas de RT-PCR, western blotting e imunohistoquímica para examinar o padrão de expressão dos receptores EP no hipocampo, e como esse padrão era modulado por alterações na atividade neuronal. Foi mostrado que todos os subtipos de receptores EP são expressos no hipocampo, tanto em neurônios quanto em células da glia, visto que a imunoreatividade para os diferentes receptores EP está co-localizada com a imunoreatividade do marcador neuronal NeuN e do marcador astrocitário GFAP. Quantitativamente, os receptores EP2 e EP3 são os subtipos mais abundantes no hipocampo, seguido pelos receptores EP1 e EP4. Apesar destas diferenças quantitativas, tem sido sugerido que todos os receptores EP estão presentes em quantidades suficientes para modular a transmissão sináptica, desde que foi mostrado que os níveis de todos os subtipos de receptores EP são modulados por indução de atividade sináptica nesta área cerebral (Zhu et al., 2005).

1.4. Papel fisiológico dos receptores EP no cérebro

Durante os últimos vinte anos vários estudos têm mostrado que a COX-2 e seu principal metabólito, a PGE₂, participem de um grande número de funções fisiológicas no cérebro. De fato, evidências sugerem que a COX-2 e a PGE₂ participam da regulação

de processos cerebrais importantes, incluindo o ciclo sono/vigília e termorregulação (Yamagata et al., 1993; Gerozissis et al., 1995; Hayaishi and Matsumura, 1995; Boulant et al., 1997; Ivanov and Romanovsky, 2004).

1.4.1. 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_2 e a PGE_2 como reguladoras do ciclo sono/vigília. De fato, a injeção intracerebral de PGD_2 induz sono fisiológico ortodoxo (tipo REM) e paradoxal (tipo não-REM) em várias espécies de mamíferos, ao passo que a injeção de PGE_2 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_2 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_2 , fortalecendo a idéia de um papel importante para a PGE_2 na regulação do ciclo sono/vigília. Além disso, a injeção intracerebroventricular desta prostaglandina induz estado de vigília em ratos, ao passo que induz sono quando injetada no espaço subaracnóide da porção rostral/ventral do encéfalo, sugerindo diferenças regionais no que diz respeito ao papel da PGE_2 na regulação do ciclo sono/vigília (Yoshida et al., 2000). Desde que o padrão de expressão de receptores EP e vias de sinalização associadas pode variar de uma região cerebral para outra, foi sugerido que diferentes

subtipos de receptores EP contribuem para os efeitos indutores de vigília e sono mediados pela PGE₂. De fato, usando agonistas e antagonistas seletivos de receptores EP, Yoshida et al. (2000) mostraram que a injeção intracerebroventricular de PGE₂ induz estado de vigília via ativação de receptores EP1 e EP2, enquanto que a indução do sono por PGE₂ quando injetada no espaço subaracnóide da porção rostra/ventral do encéfalo é mediada por receptores EP4.

1.4.2. 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 PGE₂ é mediador chave nesses processos. De fato, a PGE₂ altera a taxa de disparo de neurônios pré-ópticos, através da ativação de receptores EP₃ 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. Mais evidências do papel crucial dos receptores EP3 no controle da temperatura corporal vêm do fato que camundongos nocaute para o receptor EP3 apresentam diminuição na resposta febril induzida por lipolisacarídeo bacteriano (Ushikubi et al., 1998).

1.5. Papel patológico da COX-2 e da PGE₂ no cérebro

Estudos recentes têm mostrado uma participação importante da COX-2 e PGE₂ em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas associadas com alto grau de morbidade e com alta incidência na população em geral, como isquemia e convulsões.

1.5.1. 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 a 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 suscetíveis 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 dos diversos receptores EP na lesão causada por isquemia cerebral começou a ser investigada recentemente. Estudos publicados quase simultaneamente por Kawano e colaboradores (2006) e Ahmad e colaboradores (2006)

mostraram que a ativação de receptores EP1 aumenta o tamanho da lesão cerebral induzida por isquemia, causada por injeção intraestriatal de NMDA e privação de glicose e oxigênio *in vitro*, fornecendo as primeiras evidências do envolvimento de um receptor para PGE₂ neste tipo de situação neurodegenerativa. Além disso, também foi mostrado que a ativação de receptores EP3 contribui para morte celular induzida por isquemia e injeção intraestriatal de NMDA (Ahmad et al., 2007). Enquanto a ativação de receptores EP1 e EP3 é aumenta a morte celular em situações de isquemia, que a ativação de receptores EP2 e EP4 atenua a morte celular induzida por isquemia e injeção intraestriatal de NMDA (Ahmad et al., 2005; Ahmad et al., 2006), sugerindo diferenças na participação dos subtipos de receptores EP em situações de isquemia.

1.5.2. Convulsões e epilepsia

Epilepsia é uma doença neurológica crônica com incidência de 1 % na população em geral (Dichter et al., 2007). O principal sintoma da epilepsia são crises, denominadas de modo geral de convulsões. Essas convulsões são alterações comportamentais e/ou motoras resultantes de descargas episódicas anormais de um grupo de neurônios no cérebro e acarretam enorme prejuízo à qualidade de vida dos pacientes afetados e suas famílias. Enquanto a monoterapia com anticonvulsivantes promove o controle das convulsões em aproximadamente 70-80 % dos pacientes, as convulsões permanecem não-controláveis em um número significativo de pacientes, mesmo com o uso de várias drogas (Ben-Menachem et al., 2007). Assim, torna-se importante a busca por novas drogas anticonvulsivantes, e o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões torna-se de fundamental importância para este fim. Nesse sentido, um ponto que merece atenção é a associação

entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de convulsões. Estudos epidemiológicos mostraram que até 80 % dos pacientes com malária apresentam convulsões durante a inflamação aguda (Singh and Prabhakar, 2008). Além disso, pacientes com encefalite causadas por diversos agentes apresentam convulsões, que podem persistir mesmo após eliminação do agente infeccioso e são atenuadas com o tratamento com antiinflamatórios (Singh and Prabhakar, 2008). Estes dados indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de convulsões, e mediadores da inflamação como agentes prováveis deste mecanismo de excitabilidade aumentada.

O papel da COX-2 e da PGE₂ 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 e seu principal metabólito podem ter um papel importante em convulsões. Nesse contexto, 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 (Shafiq et al., 2003), e aumenta a latência para as convulsões induzidas por inalação de fluorotil em ratos neonatos (Jung et al., 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. Mais evidências que a PGE₂ tem um papel proeminente em convulsões vem dos estudos que mostraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos monoclonais anti-PGE₂

atenua as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (Oliveira et al., 2008b). Além disso, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das convulsões induzidas por este agente convulsivante (Oliveira et al., 2008b). Entretanto, o papel dos diferentes receptores EP em convulsões ainda não foi estudado, e assim o entendimento do papel destes receptores 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 (Velisek, 2006).

1.6. Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) é uma proteína de membrana plasmática que está presente em virtualmente todas as células eucarióticas e possui um papel crucial na manutenção da homeostase iônica celular (Skou and Esmann, 1992). Em 1997, o prêmio Nobel de química foi compartilhado com o pesquisador dinamarquês Jens C. Skou, pela descoberta da Na⁺,K⁺-ATPase. Embora a hipótese da existência de uma bomba de sódio tenha sido proposta anteriormente, Jens C. Skou foi o primeiro a sugerir, em 1957, uma ligação entre o transporte de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática e uma atividade ATPásica que era ativada por estes íons e está presente na membrana plasmática (Skou, 1957). A reação básica catalisada pela Na⁺,K⁺-ATPase é o transporte de 3 íons Na⁺ para o meio extracelular e de 2 íons K⁺ para o meio intracelular, usando energia proveniente da hidrólise do ATP (Skou and Esmann, 1992). Ao regular o gradiente de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática a Na⁺,K⁺-ATPase

regula também, de maneira indireta a concentração intracelular de outros íons, como Ca^{2+} , Cl^- e H^+ , e diversas substâncias como água e glicose (Skou and Esmann, 1992). O mecanismo postulado para o transporte de Na^+ e K^+ pela Na^+, K^+ -ATPase é apresentado na figura 2.

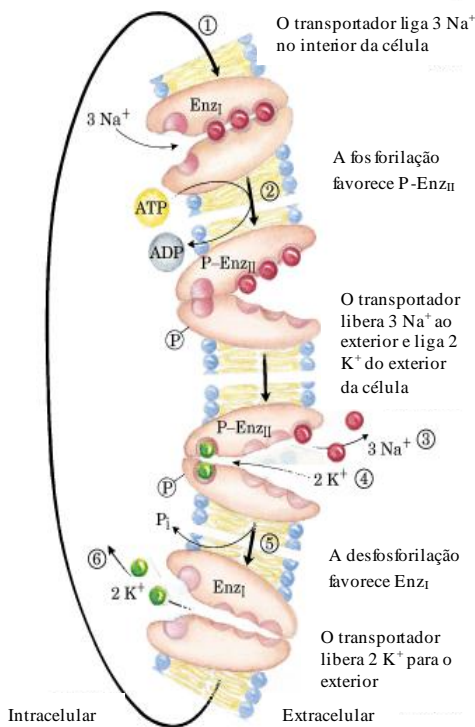


Figura 2: Mecanismo postulado para o transporte de Na^+ e K^+ pela Na^+, K^+ -ATPase. O processo inicia-se com a ligação de 3 Na^+ a sítios de alta afinidade presentes na porção interna da subunidade α , na superfície interna da membrana no interior da célula (1). A fosforilação da enzima altera sua conformação (2) e diminui sua atividade por Na^+ , levando a liberação deste no meio extracelular (3) e a ligação de 2 K^+ em sítios de alta afinidade presentes na porção extracelular (4). Após a ligação do K^+ a enzima é desfosforilada e retorna a sua configuração anterior (5), e assim o K^+ é liberado no meio intracelular (6). A proteína agora está pronta para um novo ciclo de bombeamento.

Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2002).

1.6.1. Aspectos estruturais da Na^+, K^+ -ATPase

A Na^+, K^+ -ATPase pertence à família de bombas de cátions do tipo P. A unidade funcional mínima da enzima é um heterodímero composto por uma subunidade α e uma subunidade β , e este dímero pode ainda estar co-localizado com uma proteína da família FXYD (denominada por alguns autores de subunidade γ) (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Até o momento foram clonados a partir de mamíferos 4 genes que codificam

subunidades α , e 3 genes que codificam subunidades β . As diferentes combinações entre subunidades α e β formam uma variedade de isoformas de Na^+, K^+ -ATPase que são expressas em células e tecidos específicos (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

A subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos, tem um peso molecular aproximado de 110 kDa e sua estrutura tridimensional tem 10 domínios transmembrana (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). A subunidade α contém os sítios de ligação para Na^+ e K^+ , ATP e também para o inibidor específico ouabaína (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). As diferenças na sequência primária de aminoácidos entre as 4 subunidades α encontradas até o momento em mamíferos são mínimas, mas resultam em diferenças cruciais, principalmente no que diz respeito à sensibilidade a inibidores, como a ouabaína. De fato, enquanto as isoformas contendo subunidades $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ possuem um IC_{50} para ouabaína de 28,4 nM, as isoformas contendo subunidades $\alpha 1$ possuem um IC_{50} de 89,4 μM para este mesmo inibidor (Nishi et al., 1999). Além disso, é importante mencionar que a subunidade α contém os sítios para fosforilação por PKA (serina 943 em $\alpha 1$ - $\alpha 3$) e PKC (serina 23 em $\alpha 1$), importantes para regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da Na^+, K^+ -ATPase (Fisone et al., 1994; Logvinenko et al., 1996).

A subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase é composta de aproximadamente 370 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 55 kDa (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Esta proteína possui apenas um domínio transmembrana e a porção aminoterminal está exposta ao citosol. A função exata da subunidade β ainda não está completamente entendida, mas foi demonstrado que a subunidades α não exibe atividade ATPásica quando dissociada da subunidade β . Nesse contexto, tem sido sugerido que as principais funções da subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase estão relacionadas à estabilização da conformação ótima da subunidade α na membrana

plasmática, além de uma participação direta no ciclo reacional acoplado ao transporte iônico (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

1.6.2. Regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase

Entre os vários mecanismos envolvidos na regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, a variação na concentração dos substratos Na^+ , K^+ e ATP é um dos mais simples e determinantes (Therien and Blostein, 2000). A Na^+, K^+ -ATPase é ativada por Na^+ e ATP em sítios intracelulares e por K^+ em um sítio extracelular. Entretanto, as mudanças mais críticas estão relacionadas a variações na concentração intracelular de Na^+ . O K_m da Na^+, K^+ -ATPase para Na^+ está na faixa de 10-40 mM, que na maioria dos tecidos é um valor mais alto que a concentração intracelular de Na^+ no equilíbrio (Soltoff and Mandel, 1984a). Assim, pequenas variações na concentração intracelular de Na^+ afetam profundamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na maioria dos tecidos. No caso do K^+ , a concentração extracelular de K^+ tem menos efeito sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase do que variações na concentração intracelular de Na^+ , provavelmente devido à alta afinidade deste íon por seus sítios de ligação na enzima e porque a concentração extracelular de íons K^+ é saturante para os sítios de ligação deste íon na Na^+, K^+ -ATPase. Por outro lado, tem sido mostrado que o K^+ pode agir como um antagonista competitivo da ligação do Na^+ em seus sítios de ligação na Na^+, K^+ -ATPase (Garay and Garrahan, 1973). Assim, variações na concentração intracelular de K^+ poderiam alterar a atividade da enzima através de uma modificação na afinidade da mesma por íons Na^+ (Therien et al., 1996). No que diz respeito ao ATP, a Na^+, K^+ -ATPase apresenta uma cinética linear e um K_m de 300-800 μM para este substrato (Soltoff and Mandel, 1984b).

Outro mecanismo importante para regulação da Na^+, K^+ -ATPase é a fosforilação de resíduos específicos, principalmente na subunidade α . Uma série de hormônios, neurotransmissores e outras substâncias modulam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por alterar o estado de fosforilação dos resíduos de serina 943 ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e serina 23 em $\alpha 1$ (os sítios de fosforilação para PKC em $\alpha 2$ e $\alpha 3$ ainda são motivo de controvérsia na literatura) (Fisone et al., 1994; Cheng et al., 1997b; Cheng et al., 1997a; Cheng et al., 1999; Nishi et al., 1999; Teixeira et al., 2003). A fosforilação dos resíduos de serina 943 e/ou serina 23 na subunidade $\alpha 1$ afetam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de várias maneiras, inibindo ou ativando a enzima, dependendo do tecido e tipo celular estudado. Os mecanismos pelos quais a fosforilação destes resíduos afeta a atividade da Na^+, K^+ -ATPase são variados, e incluem mudanças na afinidade pelos substratos Na^+ , K^+ e ATP e/ou aumento ou diminuição da quantidades de moléculas de enzima na membrana plasmática.

1.6.3. Aspectos fisiológicos e patológicos da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro

No cérebro, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores (Stahl and Harris, 1986). Conseqüentemente, mudanças na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afetam diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal, assim como o comportamento do animal (Moseley et al., 2007). Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (Grisar et al., 1992). De acordo, o inibidor da Na^+, K^+ -ATPase, ouabaína, aumenta o influxo de

cálcio em slices de cérebro de ratos (Fujisawa et al., 1965), causa convulsões em camundongos (Jamme et al., 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (Li and Stys, 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (Lees et al., 1990). Além disso, a supressão genética da Na^+, K^+ -ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (Moseley et al., 2007). Também é importante mencionar que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída no cérebro *post-mortem* de pacientes com epilepsia (Grisar et al., 1992) e que mutações nos genes que codificam a subunidade α estão associadas com epilepsia em humanos (Jurkat-Rott et al., 2004). Além disso, o grau de inibição da atividade da Na^+, 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., 2007), reforçando o papel importante da inibição da atividade Na^+, K^+ -ATPase nas convulsões induzidas por diversos agentes. Especialmente no que diz respeito ao ácido metilmalônico, tal correlação atinge valores impressionantes, próximos a 1 (0,994) (Furian et al., 2007).

2 OBJETIVO

2. Objetivo

Dado o elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam convulsões refratárias as drogas disponíveis atualmente, torna-se importante a busca por novas drogas anticonvulsivantes, e o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões torna-se de fundamental importância para este fim. Considerando que mediadores da inflamação como COX-2 e a PGE₂ podem contribuir de forma importante para o aumento da excitabilidade cerebral observada durante convulsões, nosso objetivo foi determinar o papel dos diferentes subtipos de receptores para PGE₂ nas convulsões induzidas por PTZ, um modelo com alto valor preditivo para o desenvolvimento de novos agentes anticonvulsivantes. Além disso, considerando níveis aumentados de PGE₂ e diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase são fenômenos comuns encontrados durante convulsões e que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase é determinante da excitabilidade celular, investigamos se a PGE₂ poderia diminuir a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo de ratos, no intuito de determinar os mecanismos moleculares envolvidos na modulação das convulsões induzidas por PTZ por receptores EP.

2.1. Hipóteses

As hipóteses testadas neste trabalho foram:

1. O antagonista de receptores EP1, SC-19220, atenua as convulsões induzidas por PTZ;
2. O agonista de receptores EP2, butaprost, atenua as convulsões induzidas por PTZ;
3. O antagonista de receptores EP3, L-826266, atenua as convulsões induzidas por PTZ;

4. O antagonista de receptores EP4, L-161982, facilita as convulsões induzidas por PTZ;
5. A incubação com PGE₂ diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de ratos;
6. A incubação com PGE₂ diminui a quantidade de moléculas de Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de ratos;
7. A incubação com PGE₂ diminui a expressão da Na⁺,K⁺-ATPase na membrana plasmática em fatias de hipocampo de ratos;
8. A incubação com PGE₂ aumenta a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de serina 943 em fatias de hipocampo de ratos;
9. O antagonista de receptores EP1, SC-19220, previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂;
10. O agonista de receptores EP2, butaprost, previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂;
11. O antagonista de receptores EP3, L-826266, previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂;
12. O antagonista de receptores EP4, L-161982, facilita a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂as convulsões induzidas por PTZ;
13. O inibidor de PKA, H-89, previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂;
14. O inibidor de PKC, GF-109203X, previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂.

CAPÍTULO II

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

MODULATION OF PENTYLENETETRAZOL-INDUCED SEIZURES BY PROSTAGLANDIN E₂ RECEPTORS

M. S. OLIVEIRA,^{a,b} A. F. FURIAN,^{a,b} L. M. RAMBO,^{a,c}
L. R. RIBEIRO,^{a,c} L. F. F. ROYES,^{a,c} J. FERREIRA,^d J. B.
CALIXTO^e AND C. F. MELLO^{a*}

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^eDepartamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brazil

Abstract—There is evidence that prostaglandin E₂ (PGE₂) facilitates the seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), but the role of PGE₂ receptors (EPs) in the development of seizures has not been evaluated to date. In the current study we investigated whether selective EP ligands alter PTZ-induced seizures in adult male Wistar rats by electrographic methods. Selective antagonists for EP1 (SC-19220, 10 nmol, i.c.v.), EP3 (L-826266, 1 nmol, i.c.v.) and EP4 (L-161982, 750 pmol, i.c.v.) receptors, and the selective EP2 agonist butaprost (100 pmol, i.c.v.) increased the latency for clonic and generalized tonic-clonic seizures induced by PTZ. These data constitute pharmacological evidence supporting a role for EPs in the seizures induced by PTZ. Although more studies are necessary to fully evaluate the anticonvulsant role these compounds and their use in the clinics, EP ligands may represent new targets for drug development for convulsive disorders. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: PGE₂, epilepsy, EEG, PTZ, rat.

Cyclooxygenases (COXs) are rate-limiting enzymes in the metabolic pathway that converts arachidonic acid to prostaglandins (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 induced at injury/inflammation sites and expressed constitutively in a few organs, such as the CNS (Yamagata et al., 1993; Vane et al., 1998). In the CNS, it has been suggested that COX-2 modulates important cerebral physiological processes, such as body temperature control, appetite, sleep and learning and memory processes (Sang and Chen, 2006).

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 EI mice present increased COX-2 expression in brain (Okada et al., 2001; Desjardins et al., 2003) and transgenic mice overexpressing neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions (Kelley et al., 1999). It is also remarkable that pharmacological treatments that increase COX-2 expression in the brain, such as interleukin-1 β and lipopolysaccharide exposure, facilitate PTZ- and bicuculline-induced seizures (Vezzani et al., 2000; Akarsu et al., 2006), respectively. Consequently, if COX-2 played a facilitatory role in seizure development, its inhibition should protect animals from developing seizures in different epilepsy experimental models. In line with this view, it has been shown that selective COX-2 inhibitors, such as celecoxib, attenuate the seizures elicited by electroconvulsive shock (Shafiq et al., 2003) and pentylenetetrazol (PTZ) (Dhir et al., 2006) (Oliveira et al., 2008). For these reasons, COX-2 has been postulated as an interesting target for drug development in epilepsy.

Recent studies have indicated that prostaglandin E₂ (PGE₂) is responsible for the neurotoxicity of COX-2. In fact, the protection afforded by selective COX-2 inhibitors against *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced cell death *in vitro* and *in vivo* are reversed by a PGE₂ analog (Carlson, 2003; Manabe et al., 2004). Interestingly, and in line with the view that excitotoxicity and seizure development may share common mechanisms (Bazan et al., 2002), the anticonvulsant effect of celecoxib against PTZ-induced seizures is also blunted by PGE₂ administration (Oliveira et al., 2008).

The biological actions of PGE₂ have been attributed to its ability to interact with plasma membrane receptors, the PGE₂ receptors (EPs) (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007). Molecular cloning has confirmed the existence of four subtypes of EPs (EP1, EP2, EP3 and EP4) (Boie et al., 1997), which are coupled to G-proteins and evoke cellular responses via distinct signaling cas-

*Corresponding author. Tel: +55-55-3220-9378; fax: +55-55-3220-8241. E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C. F. Mello).

Abbreviations: butaprost, (\pm)-15-deoxy-16S-hydroxy-17-cyclobutyl prostaglandin E₂; COX, cyclooxygenase; DMSO, dimethyl sulfoxide; EEG, electroencephalogram; EP, PGE₂ receptor; L-161982, N-[[4'-(3-butyl-1,5-dihydro-5-oxo-1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-1,2,4-triazol-4-yl)methyl][1,1'-biphenyl]-2-yl]sulfonyl]-3-methyl-2-thiophenecarboxamide; L-826266, [(2E)-N-[[5-bromo-2-methoxyphenyl]-sulfonyl]-3-[5-chloro-2-(2-naphthylmethyl)phenyl]acrylamide; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PBS, sterile phosphate-buffered saline; PGE₂, prostaglandin E₂; PTZ, pentylenetetrazol; SC-19220, 8-chloro-dibenzo[b,f][1,4]oxazepine-10(11H)-carboxylic acid-2-acetylhydrazide.

0306-4522/08/\$32.00+0.00 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.005

caedes (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007), though G-protein-independent effects have also been reported (Kawano et al., 2006).

There are only a few studies about the effects of exogenous EP ligands on brain function and pathological processes. It has been shown that EP1 receptor antagonists, as well as EP2 and EP4 agonists, reduce neuronal damage induced by ischemia and NMDA injection (Ahmad et al., 2005, 2006a,b; Kawano et al., 2006). However, the role of EPs in seizures has not been evaluated to date. Therefore, in the current study we investigated the effect of selective EP1, EP3 and EP4 receptor antagonists on the behavioral and electrographic seizures induced by PTZ, a convulsant agent that has been widely used in the study of seizure development and screening of new compounds with anticonvulsant activity. Since, to our knowledge, selective EP2 receptor antagonists are not available, the role of EP2 receptors in the seizure activity induced by PTZ was investigated by using butaprost ((±)-15-deoxy-16S-hydroxy-17-cyclobutyl prostaglandin E₁), a selective EP2 agonist.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) maintained under controlled light and environment (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 reported in this study was conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 0206). All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimize their suffering.

Drugs

PTZ was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 8-Chloro-dibenzo[b,f][1,4]oxazepine-10(11H)-carboxylic acid-2-acetylhydrazide (SC-19220) (an EP₁ antagonist) and butaprost (an EP₂ antagonist) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). [(2E)-N-[(5-bromo-2-methoxyphenyl)-sulfonyl]-3-[5-chloro-2-(2-naphthylmethyl) phenyl] acrylamide (L-826266) (an EP₃ antagonist) and N-[[4'-[[[3-butyl-1,5-dihydro-5-oxo-1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-1,2,4-triazol-4-yl]methyl][1,1'-biphenyl]-2-yl]sulfonyl]-3-methyl-2-thiophenecarboxamide (L-161982) (an EP₄ antagonist) were generously donated by Merck Froost (Kirkland, Quebec, Canada). SC-19220 was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted with sterile phosphate-buffered saline (PBS), in such a way that DMSO concentration did not exceed 1%. L-826266 and butaprost were prepared in absolute ethanol and then diluted with PBS, in such a way that ethanol concentration did not exceed 0.5%. L-161982 and PGE₂ were solubilized in PBS. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

Surgical procedures

All animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two cannulae were inserted bilaterally into the lateral ventricles (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 1.5 mm, V 2.5 mm from the dura) (Paxinos

and Watson, 1986). For electroencephalogram (EEG) recordings, two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. The experiments were performed 7–9 days after surgery.

Drug administration protocol

The effect of the i.c.v. administration of EP ligands on seizure activity induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.) was investigated by injecting the animals with SC-19220 (0.1, 1 or 10 nmol/site), butaprost (0.01; 0.1 or 1 nmol/site), L-826266 (0.01, 0.1 or 1 nmol/site), L-161982 (7.5, 75 or 750 pmol/site) or with their respective vehicles (1% DMSO in PBS; 0.5% ethanol in PBS or PBS) 15 min before the administration of PTZ. Since all the antagonists tested are competitive, their anticonvulsant effects should be reverted by the injection of the endogenous ligand, PGE₂. We investigated this possibility by injecting the animals with PGE₂ (100 ng/site, i.c.v.) or its vehicle at the same time of the injection of the EP antagonists or its respective vehicles (15 min before PTZ). All i.c.v. injections were performed by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below a guide cannula. 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. Doses and time elapsed between drug injection and PTZ injection were selected based on pilot experiments. After each experiment, the animals were injected with a dye (5 µl of Methylene Blue), deeply anesthetized with thiopental and killed 15 min thereafter. The positioning of the cannula was considered correct if the ventricular system was pigmented at the stereoscopic analysis of coronal cerebral slices. Only those animals which had a correct cannula positioning were analyzed, and animals with incorrect cannula placement accounted for less than 5% of the animals.

Seizure evaluation

Seizures were monitored in all animals by electrocorticographic recording. The groups were as follows:

- Experiment 1: vehicle (*n*=4 animals per group), SC-19220 0.1 nmol/site (*n*=4), SC-19220 1 nmol/site (*n*=5), SC-19220 10 nmol/site (*n*=8), PGE₂ (*n*=4) and PGE₂ plus SC-19220 10 nmol/site (*n*=7).
- Experiment 2: vehicle (*n*=4), butaprost 0.01 nmol/site (*n*=6), butaprost 0.1 nmol/site (*n*=7), butaprost 1 nmol/site (*n*=5).
- Experiment 3: vehicle (*n*=5), L-826266 0.01 nmol/site (*n*=5), L-826266 0.1 nmol/site (*n*=9), L-826266 1 nmol/site (*n*=14), PGE₂ (*n*=5) and PGE₂ plus L-826266 1 nmol/site (*n*=8).
- Experiment 4: vehicle (*n*=5), L-161982 7.5 pmol/site (*n*=5), L-161982 75 pmol/site (*n*=5), L-161982 750 pmol/site (*n*=10), PGE₂ (*n*=4) and PGE₂ plus L-161982 1 nmol/site (*n*=8).

At the day of the experiments, each animal was transferred to a Plexiglas cage (25×25×40 cm) and habituated for 20 min before EEG recording. The rat was then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage, and the EEG was recorded using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neurotec Ltd, Itajubá, MG, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After baseline recording, EP ligands or their respective vehicles were administered and, 15 min thereafter, PTZ (60 mg/kg, i.p.) was administered. The animals were observed for the appearance of clonic and generalized tonic-clonic convulsive episodes for 20 min according to Ferraro et al. (1999), who describes clonic convulsions as episodes characterized by typical

partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Such clonic events typically last 1–2 s and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization. Generalized convulsive episodes were considered as generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation, respectively. PTZ-induced generalized convulsions typically lasted between 30 and 60 s, and were followed by a quiescent period. During the 20-min observation period, the latencies for the first clonic and first generalized tonic–clonic convulsions were measured. EEG recordings were visually analyzed for seizure activity, which were defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s ≥ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s). Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded.

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed by the Kruskal–Wallis test (nonparametric one-way analysis of variance), and are presented as median and interquartile ranges. Post hoc analyses were carried out by the Dunn's multiple comparison test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and P and H values are shown only if $P < 0.05$.

RESULTS

Fig. 1A and 1B shows the effect of increasing doses of SC-19220, a selective EP1 receptor antagonist, on the latency for clonic and for generalized tonic–clonic convulsions induced by PTZ. Statistical analysis (Kruskal–Wallis test followed by the nonparametric multiple comparisons Dunn test) revealed that SC-19220 (10 nmol/site), increased the latency for clonic [$H(3) = 12.102$; $P < 0.05$, Fig. 1A] and generalized [$H(3) = 12.359$; $P < 0.05$, Fig. 1B] seizures. Representative EEGs showing the anticonvulsant effect of SC-19220 are depicted in Fig. 1C–F. The injection of PTZ caused the appearance of multispikes plus slow waves and major seizure activity. Multispikes plus slow waves correlated with characteristic myoclonic jerks, while PTZ-induced generalized seizures were characterized by the appearance of 2–3 Hz high-amplitude activity in the recording leads and the behavioral repertoire described above. After the ictal discharge, postictal EEG suppression and slow waves, which correlated with behavioral catalepsy, were recorded. SC-19220 (10 nmol/site, i.c.v.) increased the latency for PTZ-induced seizures, characterized in the EEG as multiple sharp waves in brief spindle episodes (Fig. 1C–F) and behaviorally as myoclonic jerks.

The administration of the selective EP2 agonist, butaprost, increased the latency for PTZ-induced clonic [$H(3) = 9.644$; $P < 0.05$, Fig. 2A] and generalized tonic–clonic [$H(3) = 9.788$; $P < 0.05$, Fig. 2B] seizures in a dose-dependent manner, up to 0.1 nmol/site. As the dose of butaprost was increased to 1 nmol/animal, latency scores returned to control values, yielding an inverted U-shaped dose–effect curve. The representative EEGs depicted in Fig. 2C–F

show that butaprost delays seizures, but does not alter PTZ-induced wave patterns.

Fig. 3A and 3B shows the effect of increasing doses of L-826266, a selective EP3 receptor antagonist, on the latency for clonic and generalized tonic–clonic seizures induced by PTZ. Statistical analysis (Kruskal–Wallis test followed by nonparametric multiple comparisons Dunn test) revealed that L-826266 (1 nmol/site) increased the latency for clonic [$H(3) = 22.429$; $P < 0.05$, Fig. 3A] and generalized tonic–clonic [$H(3) = 19.302$; $P < 0.05$, Fig. 3B] seizures. Representative EEGs depicted in Fig. 3C–F show that L-826266 (1 nmol/site) delays seizures.

The effect of the selective EP4 receptor antagonist L-161982 on PTZ-induced seizures is shown in Fig. 4A and 4B. Statistical analysis (Kruskal–Wallis test followed by nonparametric multiple comparisons Dunn test) revealed that L-161982 (750 pmol/site) increased the latency for clonic [$H(3) = 19.860$; $P < 0.05$, Fig. 4A] and the generalized tonic–clonic [$H(3) = 19.853$; $P < 0.05$, Fig. 4B] seizures. Representative EEGs depicted in Fig. 4C–F show that L-161982 (750 pmol/site) delays PTZ-induced seizures. Analysis of EEG recordings from animals treated with SC-19220 (3 of 5), butaprost (2 of 7), L-826266 (3 of 13) and L-161982 (1 of 9), which did not present generalized seizures, revealed the occurrence of multiple sharp waves in brief spindle episodes, which correlated with hypoactivity and tremor. The fact that subeffective doses of PTZ (20–35 mg/kg) induce this EEG pattern (Andre et al., 1998) further support the view that EP1, EP3 and EP4 antagonists and an EP2 agonist attenuate seizure activity.

Since all the antagonists tested are competitive, their anticonvulsant effects should be reverted by the injection of the endogenous ligand, PGE₂. We found that the administration of PGE₂ (100 ng/site, i.c.v.) blunted the anticonvulsant effect of all antagonists tested, measured by both the latencies for clonic and generalized tonic–clonic seizures (Figs. 1, 3 and 4; A and B). The electrographic pattern of the seizures presented by animals injected with PGE₂ plus EP antagonist plus PTZ in these sets of experiments (Figs. 1, 3 and 4; G and H) was very similar to that presented by animals treated only with vehicle plus PTZ (Figs. 1–4; C and D).

DISCUSSION

In the current study we showed that EPs modulate PTZ-induced seizures. Specifically, we showed that the i.c.v. administration of EP1, EP3 and EP4 antagonists, and of an EP2 agonist, increases the latency for clonic and generalized seizures induced by PTZ. Moreover, we showed that the i.c.v. administration of PGE₂ blunted the anticonvulsant effects of all the antagonists tested.

There are lines of evidence suggesting that inflammation plays a role in seizure activity and that prostaglandins mediate seizure- and NMDA-induced excitotoxicity (for a review see Vezzani and Granata, 2005). For instance, patients with temporal lobe epilepsy and the genetically seizure-susceptible E1 mice have increased COX-2 expression in brain (Okada et al., 2001; Desjardins et al.,

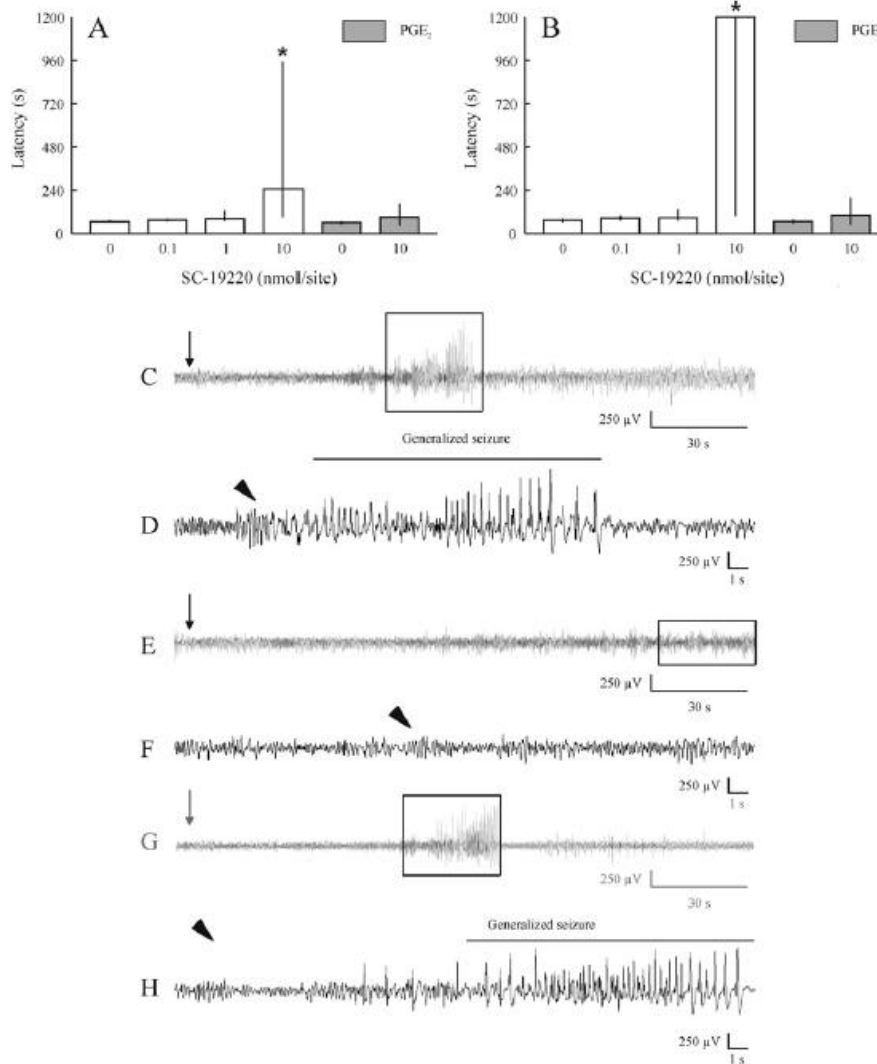


Fig. 1. EP1 receptor antagonist SC-19220 (0.1; 1 or 10 nmol/site, i.c.v.) increases the latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). The i.c.v. administration of PGE₂ (100 ng/site) blunted the anticonvulsant action of SC-19220 (10 nmol/site), measured by both the latencies for clonic (A) and generalized (B) seizures induced by PTZ. * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Dunn's nonparametric multiple comparison test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 4-8$ in each group. Also shown are typical seizure sequences observed after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in an animal treated with (C) vehicle (1% DMSO in PBS, i.c.v.), (E) SC-19220 (10 nmol/site, i.c.v.) or (G) PGE₂ (100 ng/site, i.c.v.) plus SC-19220 (10 nmol/site, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C, E and G are shown in D, F and H, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the arrowhead indicates the EEG pattern associated with clonic seizures and the top black bar indicates the EEG pattern associated with generalized tonic-clonic seizures.

2003). Moreover, transgenic mice overexpressing neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions (Kelley et al., 1999) and selective COX-2 inhibitors, such as rofecoxib, nimesulide and celecoxib decrease PTZ-induced seizures in rats (Dhir et al., 2006) (Oliveira et al., 2008). Moreover, the anticonvulsant effect of celecoxib against PTZ-induced seizures is blunted by PGE₂ administration (Oliveira et al., 2008), further supporting the involvement of COX-2 and PGE₂ in seizure development. However, because of severe adverse effects that may arise from long-term treatment with COX-2 inhibitors, in-

cluding an increased risk of stroke and myocardial infarction (Topol and Falk, 2004), reducing PGE₂ levels with COX-2 inhibitors may not be a safe measure. In line with this view, blocking EPs could be a reasonable therapeutic alternative to decrease COX-2/PGE₂ pathway overactivation (FitzGerald, 2003; Dore, 2006).

In this study we showed that blocking EP1 or EP3 receptors decreases PTZ-induced seizures. To our knowledge, this is the first study about the effects of exogenous EP ligands on seizures. Therefore, since there are lines of evidence suggesting that excitotoxicity and seizure devel-

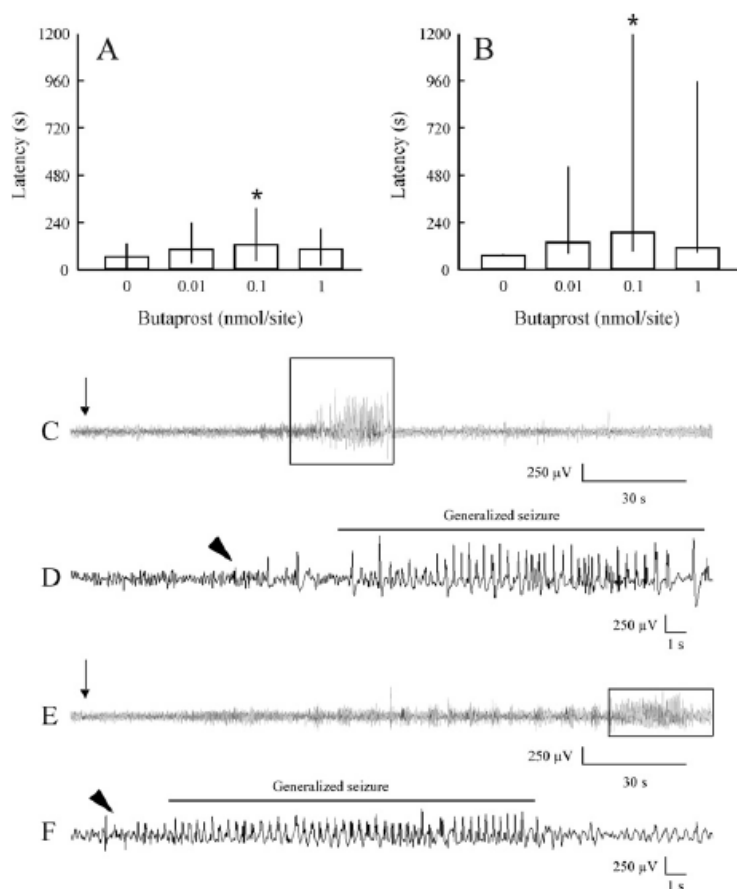


Fig. 2. EP2 receptor agonist butaprost (0.01; 0.1 or 1 nmol/site, i.c.v.) increases the latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Dunn's nonparametric multiple comparison test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 4-7$ in each group. Also shown are typical seizure sequences observed after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in PBS, i.c.v.) or (E) butaprost (0.01 nmol/site, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C and E are shown in D and H, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the arrowhead indicates the EEG pattern associated with myoclonic jerks and the top black bar indicates the EEG pattern associated with generalized tonic-clonic seizures.

opment may share common mechanisms (Bazan et al., 2002), our results will be discussed in light of the previous reports on the anti-excitotoxic action of EP ligands. Accordingly, pharmacological or genetic suppression of EP1 receptor activity limits acute brain damage. In fact, the i.c.v. administration of EP1 receptor antagonists ONO8713 or SC51089 reduces neuronal death induced by injection of NMDA, oxygen-glucose deprivation and transient middle cerebral artery occlusion (Ahmad et al., 2006a; Kawano et al., 2006). In addition, EP1 receptor knockout mice present less neuronal damage due to acute exposition to NMDA and transient middle cerebral artery occlusion (Ahmad et al., 2006a; Kawano et al., 2006) than wild-type mice, further suggesting a facilitatory role for EP1 receptors in acute excitotoxicity. Interestingly, it has also been proposed that EP3 receptor activation facilitates acute excitotoxicity (Ahmad et al., 2007). In line with this view, while the genetic deletion of EP3 receptor protects mice from neuronal cell death induced by intrastriatal injection of

NMDA or transient middle cerebral artery occlusion, the i.c.v. administration of ONO-AE-248 (an EP3 selective agonist) exacerbates neuronal cell death in both models of acute excitotoxicity (Ahmad et al., 2007). Therefore, the finding that EP1 or EP3 receptor blockade has anticonvulsant properties (Figs. 1 and 3) reported in this study would be in agreement with the current knowledge about the role of these receptors in acute models of excitotoxicity.

We also showed that an EP2 selective agonist, butaprost, increased the onset latency for PTZ-induced seizures. This finding is in agreement with the study from (McCullough et al., 2004), who have shown a protective effect of butaprost against neuronal cell death induced by NMDA and oxygen glucose deprivation, and that EP2 knockout mice have increased cerebral infarction in cerebral cortex and subcortical structures compared with their wild counterparts. Moreover, the i.c.v. injection of butaprost reduces the neuronal cell death induced by NMDA in

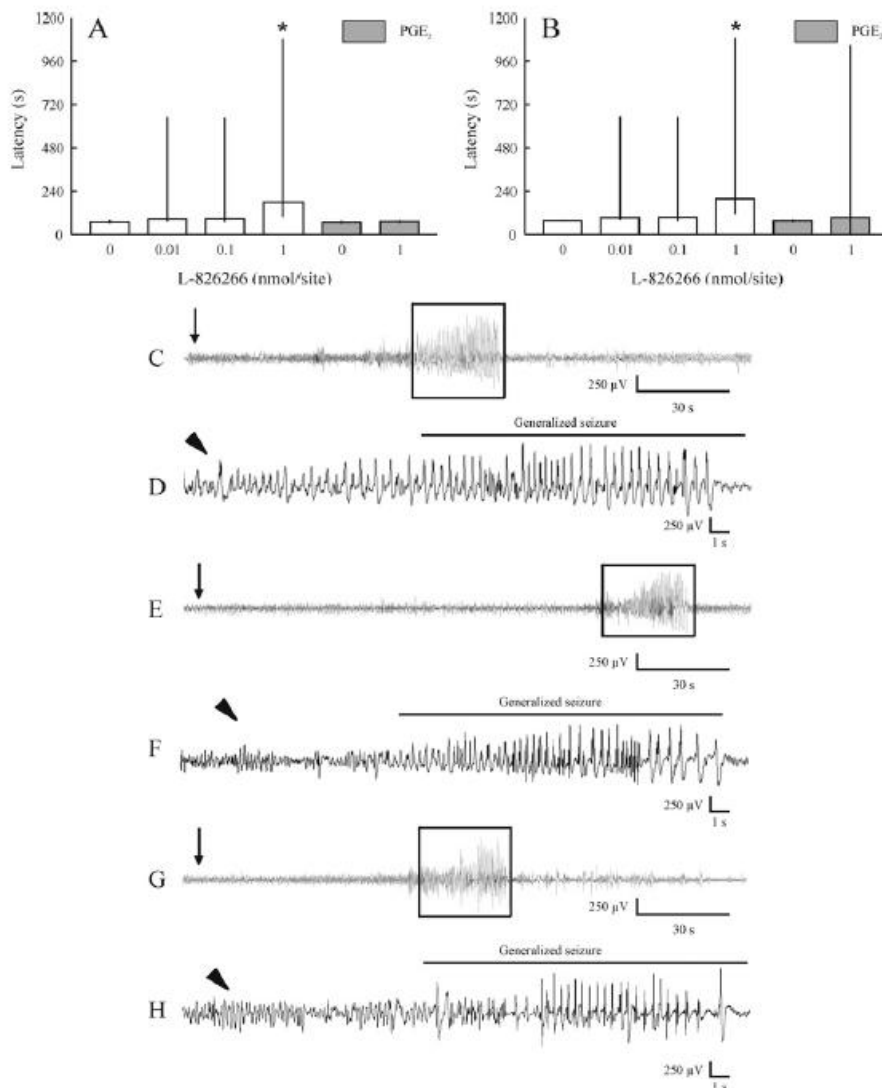


Fig. 3. EP3 receptor antagonist L-826266 (0.01; 0.1 or 1 nmol/site, i.c.v.) increases the latency for clonic (A) and generalized tonic–clonic (B) seizures induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). The i.c.v. administration of PGE₂ (100 ng/site) blunted the anticonvulsant action of L-826266 (1 nmol/site), measured by both the latencies for clonic (A) and generalized (B) seizures induced by PTZ. * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Dunn's nonparametric multiple comparison test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 5–14$ in each group. Also shown are typical seizure sequences observed after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in PBS, i.c.v.), (E) L-826266 (1 nmol/site, i.c.v.) or (G) PGE₂ (100 ng/site, i.c.v.) plus L-826266 (1 nmol/site, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C, E and G are shown in D, F and H, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the arrowhead indicates the EEG pattern associated with clonic seizures and the top black bar indicates the EEG pattern associated with generalized tonic–clonic seizures.

the striatum (Ahmad et al., 2006b), further suggesting that EP2 receptor activation causes neuroprotection. Interestingly, Ahmad et al. (2006b) have found that butaprost caused maximal protection at intermediate, but not at high doses. In a similar fashion, in the present study we also found that butaprost delayed the onset of PTZ-induced seizures at an intermediate (0.1 nmol/site), but not at a high dose (1 nmol/site) (Fig. 2). Although the exact mechanisms underlying such bell-shaped effects are not defined, it is important to point out that EP2 receptor activa-

tion can be deleterious in some situations (Liang et al., 2005).

Regarding the presently reported anticonvulsant effect of EP4 receptor blockade, a review of currently available literature about the neurotoxic effect of EP4 ligands may reveal an apparent contradictory finding, since it has been shown that EP4 receptor activation offers neuroprotection. In fact, the i.c.v. injection of the selective EP4 receptor agonist ONO-AE1-329 significantly reduced the neuronal cell death induced by the intrastriatal administration of

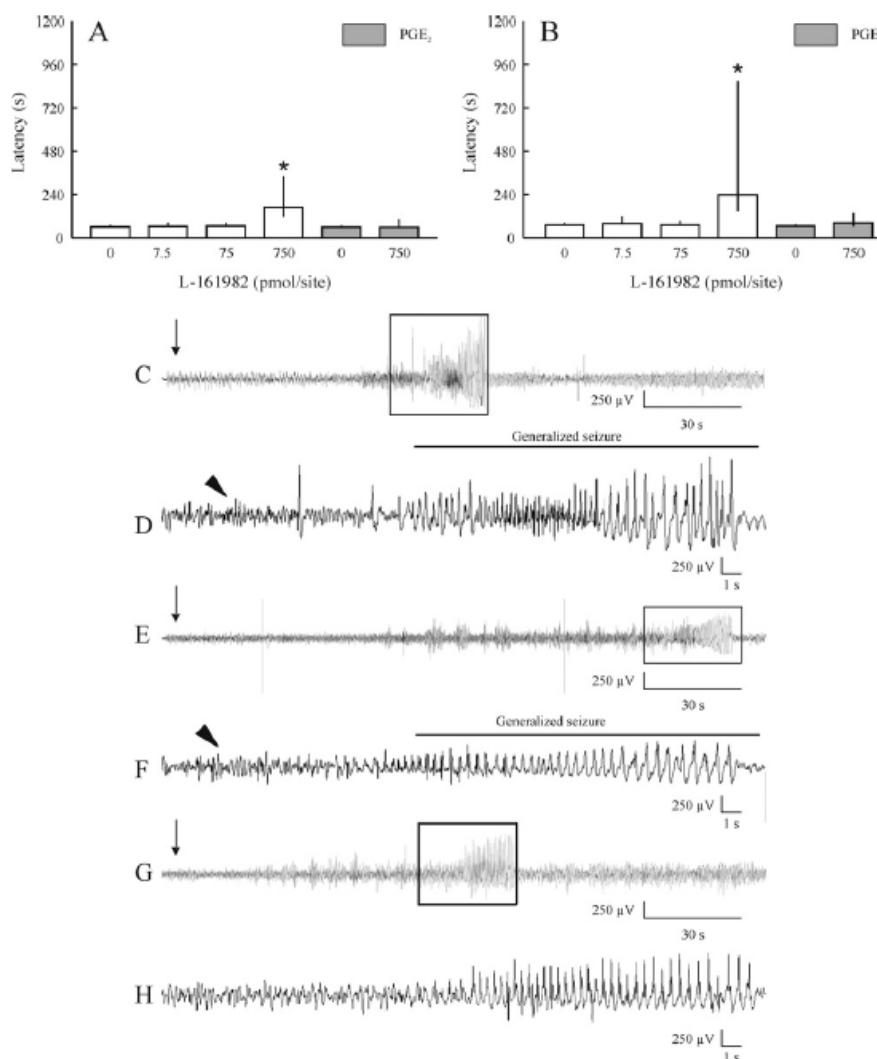


Fig. 4. EP4 receptor antagonist (7.5; 75 or 750 pmol/site, i.c.v.) increases the latency for clonic (A) and generalized tonic–clonic (B) seizures induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). The i.c.v. administration of PGE₂ (100 ng/site) blunted the anticonvulsant action of L-161982 (750 pmol/site), measured by both the latencies for clonic (A) and generalized (B) seizures induced by PTZ. * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Dunn's nonparametric multiple comparison test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 5–10$ in each group. Also shown are typical seizure sequences observed after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in an animal treated with (C) vehicle (PBS, i.c.v.), (E) L-161982 (750 pmol/site, i.c.v.) or (G) PGE₂ (100 ng/site, i.c.v.) plus L-161982 (750 pmol/site, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C, E and G are shown in D, F and H, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the arrowhead indicates the EEG pattern associated with clonic seizures and the top black bar indicates the EEG pattern associated with generalized tonic–clonic seizures.

NMDA (Ahmad et al., 2005). In addition, the incubation with 1-hydroxy-PGE₁, an EP3/EP4 agonist with slight preference toward EP4 receptors, prevents the amyloid β -peptide-induced neurotoxicity, an *in vitro* model of Alzheimer's disease (Echeverria et al., 2005). Therefore, one might expect that EP4 receptor blockade would facilitate PTZ-induced seizures. Instead, we found that the EP4 receptor selective antagonist L-161982 increased the latency for PTZ-induced seizures (Fig. 4). Although both EP2 and EP4 receptors are coupled to Gs proteins and increase cyclic AMP levels, current evidence indicates that other signal transduction pathways may be recruited by the ac-

tivation of these receptors (Sugimoto and Narumiya, 2007) and, thus, different outcomes can be found upon activation of EP2 and EP4 receptors. For instance, the protective effect of butaprost against A β exposure is blunted by the protein kinase A inhibitor RpcAMPS, whereas the protective effect of 1-hydroxy-PGE₁ is not, implying differences between EP2 and EP4 receptor protective mechanisms (Echeverria et al., 2005), which may contribute to different outcomes following EP4 receptor modulation.

Another point to be addressed is the specificity of the EP ligands. Since in the current study the administration of PGE₂ (100 ng/2 μ l, i.c.v.) blunted the anticonvulsant ef-

fects of all the antagonists tested, and these compounds were discovered in assays covering a broad range of possible targets (Boie et al., 1997; Machwate et al., 2001; Michel Gallant, unpublished observations) it seems unlikely that the currently reported anticonvulsant effect of selective EP antagonists is due to non-specific effects.

In the present study we used a solution of 0.5% ethanol in PBS as the vehicle for the EP2 agonist and the EP3 antagonist. At this concentration we did not find any effect of ethanol on PTZ-induced seizures. Accordingly, the latency for clonic and generalized seizures in the animals injected with 0.5% ethanol in PBS (the vehicle for the EP2 agonist and EP3 antagonist, Figs. 2 and 3) and PTZ was identical to the latency for clonic and generalized seizures observed in animals injected with PBS only, and PTZ (Fig. 4C–D). Moreover, the injection of solutions containing 0.5% ethanol did not alter the pattern of the EEG recordings, when compared with the pattern of basal recordings. Therefore, in our experimental conditions, it appears that ethanol did not contribute to the currently reported anticonvulsant effect of the EP2 agonist and of the EP3 antagonist.

CONCLUSION

In summary, in this study we show pharmacological evidence that PTZ-induced seizures can be modulated by EP ligands. Although more studies are necessary to fully evaluate the anticonvulsant role of these compounds and their use in clinics, EP ligands may represent new targets for drug development for convulsive disorders.

Acknowledgments—Work supported by CNPq (grants: 500120/2003-0, 505527/2004-9 and 472300/2004-0) and CAPES. M.S. Oliveira is the recipient of a CAPES fellowship. A.F. Furian, J. Ferreira, J.B. Calixto and C.F. Mello are the recipients of CNPq fellowships. Authors acknowledge Merck Froost, which kindly supplied L-828266 and L-1616982.

REFERENCES

- Ahmad AS, Ahmad M, de Brum-Fernandes AJ, Dore S (2005) Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res* 1066:71–77.
- Ahmad AS, Saleem S, Ahmad M, Dore S (2006a) Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage. *Toxicol Sci* 89:265–270.
- Ahmad AS, Zhuang H, Echeverria V, Dore S (2006b) Stimulation of prostaglandin EP2 receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurotrauma* 23:1895–1903.
- Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Dore S (2007) Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol* 184:172–179.
- 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.
- Andre V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A (1998) Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 10:2094–2106.
- Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turco EB (2002) What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res* 135:175–185.
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340:227–241.
- 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.
- 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.
- 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 (2006) GPCR antagonists as an alternative to COX-2 inhibitors: a case for the PGE2 EP1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:458–460.
- Echeverria V, Clerman A, Dore S (2005) Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur J Neurosci* 22:2199–2206.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (1999) Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733–6739.
- FitzGerald GA (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:879–890.
- 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.
- Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K (2005) Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:10180–10187.
- Machwate M, Harada S, Leu CT, Seedor G, Labelle M, Gallant M, Hutchins S, Lachance N, Sawyer N, Slipetz D, Metters KM, Rodan SB, Young R, Rodan GA (2001) Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2). *Mol Pharmacol* 60:36–41.
- 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.
- McCullough CD, Horne MK, Finkelstein DI, Wong JY, Berkovic SF, Drago J (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234–243.
- McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K (2004) Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:257–268.
- Melnikova T, Savonenko A, Wang Q, Liang X, Hand T, Wu L, Kaufmann WE, Vehmas A, Andreasson KI (2006) 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.
- Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL, Nagayama T, Rose ME, Stetler RA, Isakson PC, Chen J, Graham SH (1998) Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10954–10959.

- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193–1226.
- Okada K, Yuhi T, Tsuji S, Yamashita U (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible E1 mice was increased after seizure. *Brain Res* 894:332–335.
- Oliveira MS, Furian AF, Royes LFF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavaleiro EA, Mello CF (2008) Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* doi:10.1016/j.eplepsyres.2007.12.008.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Sang N, Chen C (2006) Lipid signaling and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 12:425–434.
- Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P (2003) 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.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387–437.
- Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282:11613–11617.
- Topol EJ, Falk GW (2004) A coxib a day won't keep the doctor away. *Lancet* 364:639–640.
- 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.
- Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, De Luigi A, De Simoni MG, Sperk G, Andell-Jonsson S, Lundkvist J, Iverfeldt K, Bartfai T (2000) Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11534–11539.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371–386.

(Accepted 10 January 2008)
(Available online 12 January 2008)

Prostaglandin E₂ modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases

Mauro Schneider Oliveira,^{*†} Ana Flávia Furian,^{*†} Leonardo Magno Rambo,^{*‡} Leandro Rodrigo Ribeiro,^{*‡} Luiz Fernando Freire Royes,^{*‡} Juliano Ferreira,[§] João Batista Calixto,[¶] Luis Fernando Pacheco Otalora,^{**} Emilio Rafael Garrido-Sanabria^{**††} and Carlos Fernando Mello^{*}

^{*}Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

[†]Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

[‡]Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

[§]Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

[¶]Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

^{**}Department of Biological Sciences, The University of Texas/Texas Southmost College, Brownsville, Texas, USA

^{††}Center for Biomedical Studies, Brownsville, Texas, USA

Abstract

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is quantitatively one of the major prostaglandins synthesized in mammalian brain, and there is evidence that it facilitates seizures and neuronal death. However, little is known about the molecular mechanisms involved in such excitatory effects. Na⁺,K⁺-ATPase is a membrane protein which plays a key role in electrolyte homeostasis maintenance and, therefore, regulates neuronal excitability. In this study, we tested the hypothesis that PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity, in order to shed some light on the mechanisms underlying the excitatory action of PGE₂. Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined by assessing ouabain-sensitive ATP hydrolysis. We found that incubation of adult rat hippocampal slices with PGE₂ (0.1–10 μM) for 30 min decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in a concentration-dependent manner. However, PGE₂ did not alter Na⁺,K⁺-ATPase activity if added to hippocampal homogenates. The inhibitory effect of PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity was not related to a decrease in the total or plasma membrane immuncontent of the catalytic α subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. We found that the inhibitory

effect of PGE₂ (1 μM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity was receptor-mediated, as incubation with selective antagonists for EP1 (SC-19220, 10 μM), EP3 (L-826266, 1 μM) or EP4 (L-161982, 1 μM) receptors prevented the PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. On the other hand, incubation with the selective EP2 agonist (butaprost, 0.1–10 μM) increased enzyme activity *per se* in a concentration-dependent manner, but did not prevent the inhibitory effect of PGE₂. Incubation with a protein kinase A (PKA) inhibitor (H-89, 1 μM) and a protein kinase C (PKC) inhibitor (GF-109203X, 300 nM) also prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. Accordingly, PGE₂ increased phosphorylation of Ser943 at the α subunit, a critical residue for regulation of enzyme activity. Importantly, we also found that PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity *in vivo*. The results presented here imply Na⁺,K⁺-ATPase as a target for PGE₂-mediated signaling, which may underlie PGE₂-induced increase of brain excitability.

Keywords: cyclooxygenase-2, neuroinflammation, neuroprotection, prostanoid, sodium pump.
J. Neurochem. (2009) **109**, 416–426.

Received October 22, 2008; revised manuscript received January 21, 2009; accepted January 25, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Carlos Fernando Mello, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.
E-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

Abbreviations used: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; BSA, bovine serum albumin; COX-2, cyclooxygenase-2; PBS, phosphate-buffered saline; PGE₂, prostaglandin E₂; SDS, sodium dodecyl sulfate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; TBS-T, Tris-buffered saline with Tween 20.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is quantitatively the major prostaglandin synthesized through the cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway in mammalian brain, and plays a central role in the modulation of synaptic signaling and excitability, both in physiological and pathological situations (Chen & Bazan 2005b). For instance, clinical and experimental studies have shown that PGE₂ levels increase during seizures (Loscher & Siemes 1988, Navarro *et al.* 1989), ischemia (Aktan *et al.* 1991, Kempinski *et al.* 1987) and traumatic brain injury (Ellis *et al.* 1981a, Ellis *et al.* 1981b), and that decreasing PGE₂ levels with COX-2 selective inhibitors decreases seizures and neuronal death associated with these pathological conditions. In fact, COX-2 inhibition increases the latency for pentylenetetrazol-induced seizures (Oliveira *et al.* 2008b), inhibits the altered hippocampal neurogenesis and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus (Jung *et al.* 2006), improves learning and memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease (Kotilinek *et al.* 2008), attenuates neuronal death in experimental models of cerebral ischemia (Nakayama *et al.* 1998) and traumatic brain injury (Cemak *et al.* 2001). These findings support the notion that PGE₂ may play a role in the pathophysiology of different neurodegenerative diseases in which excitotoxicity has been implicated. However, little is known about the molecular mechanisms by which PGE₂ facilitates excitatory activity.

Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) is an ubiquitous plasma membrane protein, which plays a key role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis in virtually all tissues (Skou & Esmann 1992). In the central nervous system, Na⁺,K⁺-ATPase activity significantly accounts for the maintenance of the electrochemical gradient across the plasma membrane underlying resting and action potentials and modulation of neurotransmitter release and uptake (Stahl & Harris 1986). As a consequence, a decrease of Na,K-ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as animal behavior. Accordingly, the Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor ouabain increases Ca²⁺ entry into brain slices (Fujisawa *et al.* 1965), causes electrographically recorded seizures in mice (Jamme *et al.* 1995), glutamate release by reversal of Na⁺-dependent transporter in the rat spinal cord (Li & Stys 2001) and cell death in rat hippocampus (Lees *et al.* 1990). Moreover, genetic suppression of Na⁺,K⁺-ATPase activity impairs spatial learning and increases anxiety-related behavior (Moseley *et al.* 2007). It is also remarkable that decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity has been found in the post-mortem epileptic human brain (Grisar *et al.* 1992), and a mutation in the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene has been associated with epilepsy in humans (Jurkat-Rott *et al.* 2004).

Considering that both increased brain PGE₂ levels and decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity are common findings in excitotoxic conditions, we decided to investigate whether these biological events are related. We hypothesized that PGE₂

decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. As the plasma membrane EP receptors (EP1, EP2, EP3 and EP4) have been implicated in the biological actions of PGE₂ (Narumiya *et al.* 1999, Sugimoto & Narumiya 2007), we investigated whether these receptors mediate the inhibitory effect of PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. In addition, given that protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) are major downstream kinases involved in EP receptor signaling (Sugimoto & Narumiya 2007), and these kinases regulate Na⁺,K⁺-ATPase activity (Nishi *et al.* 1999, Cheng *et al.* 1999, Cheng *et al.* 1997b), we investigated whether they are involved in the currently described inhibitory effect of PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity.

Experimental procedures

Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) maintained under controlled light and environment (12-h light/dark cycle, 24 ± 1°C, 55% relative humidity) with free access to food and water were used. Animal utilization reported in this study was conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and with the Institutional and National regulations for animal research. All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimize their suffering.

Drugs and reagents

Prostaglandin E₂, the selective EP1 antagonist SC-19220 and the selective EP2 agonist butaprost (free acid) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). The selective EP3 and EP4 antagonists (L-826266 and L-161982, respectively) were generously donated by Merck Frost (Kirkland, Quebec, Canada). PGE₂, EP receptor ligands and protein kinase inhibitors were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide and then diluted with artificial cerebrospinal fluid (aCSF), in such a way that dimethyl sulfoxide concentration did not exceed 0.005%. Primary antibodies for immunodetection of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit and phosphorylated Ser943 at Na⁺,K⁺-ATPase α subunit were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA, catalog numbers sc-28800 and sc-16710 respectively). Reagents for western blotting were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) and reagents for biotinylation were purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). All other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

In situ experiments

Animals were killed by decapitation and the hippocampus was immediately dissected and used for the preparation of slices (400 μ m thick) with a McIlwain tissue chopper. Slices were suspended in a pre-gassed (carbogen) aCSF containing (in mM): 1.25 NaH₂PO₄; 22 NaH₂CO₃; 1.8 MgSO₄; 129.0 NaCl; 1.8 CaCl₂; 3.5 KCl; 10 D-glucose, and pH was adjusted to 7.4 with carbogen. The viability of hippocampal slices was assessed at 0, 30, 60 and 90 min after preparation by measuring lactate dehydrogenase activity with a standard commercial kit (Labtest, Porto Alegre,

RS, Brasil). Hippocampal slices were viable for more than 60 min after preparation, and all experiments were performed within this time window (data not shown).

The effect of PGE₂ on hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity was investigated by incubating 10–12 slices for 30 min at 37°C with increasing concentrations of PGE₂ (0, 0.1, 1 or 10 μM). The concentrations of PGE₂ used in the current study were chosen based in previous studies that have demonstrated an excitatory action of PGE₂ on hippocampal slices (Chen & Bazan 2005a, Chen *et al.* 2002, Sang *et al.* 2005), and are comparable to PGE₂ doses used in previous *in vivo* studies (Oliveira *et al.* 2008a, Oliveira *et al.* 2008b). After the incubation period, the medium was discarded and slices were gently homogenized (7–10 strokes) in ice-cold 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity. In a separate set of experiments, PGE₂ (0, 0.1, 1 or 10 μM) was added directly to the reaction medium containing hippocampal homogenates, in order to determine whether PGE₂ decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity by directly interacting with the enzyme.

The role of EP receptors in PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity was studied by incubating hippocampal slices with PGE₂ (1 μM) and selective antagonists for EP1 (100 μM), EP3 (1 μM) or EP4 (1 μM) receptors. As, to our knowledge, selective EP2 antagonists are not available, the role of EP2 receptors was investigated by using the selective agonist butaprost (0.1–10 μM). The concentrations of EP receptors ligands used in the present study were selected considering their respective Ki for EP receptors and the concentration of PGE₂ used.

In those experiments designed to investigate the role of protein kinases in the PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity, hippocampal slices were incubated for 15 min with a PKA inhibitor (H-89, 1 μM) or a PKC inhibitor (GF-109203X, 300 nM), and then PGE₂ (1 μM) was added to the incubation medium, as described above.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements

Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured according by Wyse *et al.* (2000). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂ and 50 μg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 350 μL. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 70 μL of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), using KH₂PO₄ as reference standard. Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

In a separate set of experiments we investigated whether some Na⁺,K⁺-ATPase α isoform is selectively inhibited by PGE₂. For this purpose, we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi *et al.*, 1999). We determined whether PGE₂ inhibited ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μM (that inhibits Na⁺,K⁺-ATPase isoforms con-

taining α₂ and α₃ subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms).

Immunodetection of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit

In order to investigate whether the PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity was because of a decrease in enzyme content, we measured the total immunoreactivity for the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit in hippocampal slices by slot blot, according to Charlemagne *et al.* (1994), with minor modifications. Briefly, hippocampal slices were homogenized in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and centrifuged at 3000 g at 4°C for 3 min. The supernatant was centrifuged at 16 000 g at 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in 5 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and protein content was normalized to 1 mg/mL. Samples (10 μg of protein) were loaded on a nitrocellulose membrane under vacuum using a slot blot apparatus (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with 4% (w/v) fat-free dry milk in PBS, containing 0.04% (v/v) Tween 20 for 2 h and incubated with a 1 : 4000 dilution of anti-Na⁺,K⁺-ATPase α subunit polyclonal antibody in PBS, containing 0.01% (w/v) sodium azide and 0.04% (v/v) Tween 20 (PBS) for 2 h. The membrane was washed three times in PBS and incubated for 1 h with anti-alkaline phosphatase secondary antibody diluted in PBS (1 : 8000). The membrane was washed three times in PBS for 5 min and developed using the 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) method. Blots were dried, scanned, and quantified with Scion Image (PC version of Macintosh compatible NIH image).

Surface biotinylation assay

Plasma membrane levels of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit were measured by surface biotinylation assay, according to Yu *et al.* (2008), with slight modifications. Briefly, after 30 min incubation with PGE₂ (1 μM), hippocampal slices were transferred to a well in a 24-well plate and were incubated on ice for 1 h in aCSF containing 1 mM sulfo-succinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1, 3-dithiopropionate (sulfo-NHS-SS-biotin). Slices were then washed three times for 5 min with ice-cold aCSF containing 10 mM glycine, and were immediately homogenized in 500 μL ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Pierce, Rockford, IL, USA), 1% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), plus a cocktail of protease inhibitors]. Homogenates were centrifuged at 13 200 g at 4°C for 20 min and supernatants were collected. Biotinylated proteins from 600 μg of total protein were precipitated with 120 μL of ultra-link immobilized streptavidin beads, diluted with the addition of 100 μL aCSF, and incubated on a rotator overnight at 4°C. Precipitates were collected after centrifuging at 3500 g for 1 min, washed with aCSF three times, and then boiled for 5 min in 30 μL SDS loading buffer. Western blots using 50 μg tissue lysates were used as controls for the total protein. Proteins eluted from the beads and total lysates were subjected to a 6% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline, containing 0.04% (v/v) Tween 20 (TBS-T) for 1 h and incubated overnight at 4°C with a 1 : 20 000 dilution of anti-Na⁺,K⁺-ATPase α subunit polyclonal antibody in 2.5% BSA in TBS-T. Membranes were washed three times in TBS-T and incubated for 1 h with anti-

horseradish peroxidase secondary antibody (1 : 500) in 2.5% BSA in TBS-T. Blots were developed using enhanced chemiluminescence detection (Bio-Rad Laboratories) and imaged with the Bio-Rad gel imaging system. Protein band densities were quantified with Scion Image.

Immunodetection of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit phosphorylation at Ser943

The state of phosphorylation of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit at Ser943 was evaluated by western blotting. We used an antibody that selectively detects the phosphorylated, but not dephosphorylated, form Ser943 at Na⁺-K⁺-ATPase α subunit (Fisone *et al.* 1994). Briefly, after the 30 min incubation with PGE₂ (1 μ M), hippocampal slices were homogenized in 500 μ L ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer, supplemented with a cocktail of phosphatase inhibitors. Homogenates were centrifuged at 13 200 *g* at 4°C for 20 min and supernatants were collected and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis exactly as described above, except that membranes were probed with the phospho-Ser943 antibody (1 : 1000). Blots were developed using enhanced chemiluminescence detection (Bio-Rad Laboratories) and imaged with the Bio-Rad gel imaging system. Protein band densities were quantified with Scion Image.

In vivo experiments

To determine whether the PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity also occurs *in vivo*, animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol, 3 mL/kg, i.p.) and a cannula was inserted unilaterally into the right lateral ventricle (coordinates relative to bregma: anteroposterior 0 mm, mediolateral 1.5 mm, ventral 2.5 mm from the dura) under stereotaxic guidance (Paxinos and Watson 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. Three days after the surgical procedure, animals were injected with PGE₂ (0, 1, 10 or 100 ng/2 μ L, i.c.v.), and 30 min thereafter Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined in hippocampal homogenates. Doses of PGE₂ used in this set experiments were chosen based on previous studies (Oliveira *et al.* 2008a, Oliveira *et al.* 2008b) and are comparable to the concentrations of PGE₂ used in the *in situ* experiments.

Protein determination

Protein content was colorimetrically determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard.

Statistical analyses

Data were analyzed by a one- or two-way ANOVA. *Post hoc* analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls test, when appropriate. Concentration-effect relationships were assessed by partitioning total sum of squares into trend (linear, quadratic or cubic) components. A probability of $p < 0.05$ was considered significant. All data are expressed as mean \pm SEM.

Results

Figure 1(a) shows a concentration-response experiment for PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices. Statistical analysis revealed that incubation with PGE₂ (0, 0.1, 1 or 10 μ M) decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices [$F(3,12) = 4.34$; $p < 0.05$]. Partitioning sum of squares into trend components revealed that PGE₂ decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices linearly with PGE₂ concentration [significant linear trend: $F(1,12) = 12.68$; $p < 0.005$]. Figure 1(b) shows the results of the experiment designed to investigate whether PGE₂ (0, 0.1, 1 or 10 μ M) altered Na⁺,K⁺-ATPase activity by directly interacting with the enzyme in hippocampal homogenates. In this experimental condition PGE₂ did not decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(3,12) = 0.02$; $p > 0.05$], suggesting that PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity is not because of a direct effect on the enzyme and requires intact cells. We also investigated whether some α isoform is selectively inhibited by PGE₂. For this purpose, we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi *et al.* 1999). We determined whether PGE₂ inhibited ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μ M (that inhibits Na⁺,K⁺-ATPase isoforms containing $\alpha 2$ and

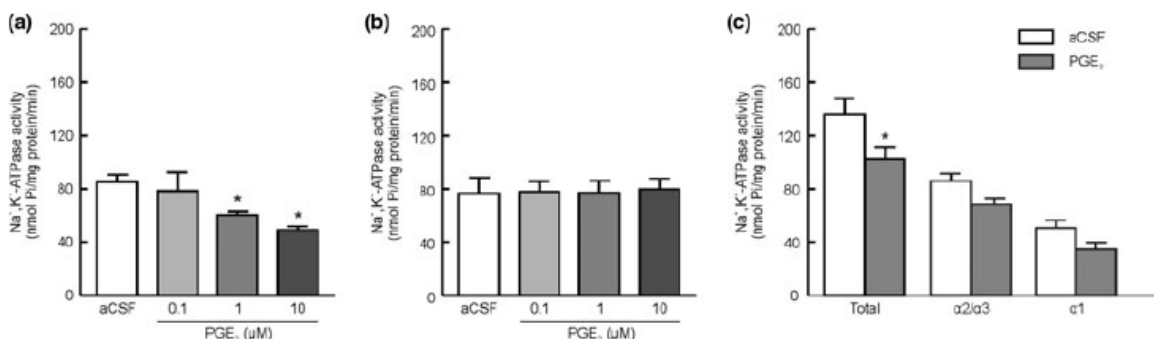


Fig. 1 Effect of PGE₂ (0, 0.1, 1 or 10 μ M) on Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat hippocampal slices (a) and homogenates (b). It is also shown the effect of PGE₂ (1 μ M) on the activity of different Na⁺,K⁺-ATPase iso-

forms (c). Data are mean \pm SEM for $n = 4$ in each group, from four different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group.

$\alpha 3$ subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms). We found that the inhibitory effect of PGE₂ on Na⁺,K⁺-ATPase activity is not isoform-specific, as it occurred in the presence of 3 μ M or 4 mM ouabain [$F(2,28) = 3.94$; $p < 0.05$] (Fig. 1c).

In order to investigate whether the PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity was because of a decrease in the levels of available enzyme molecules, we measured the total Na⁺,K⁺-ATPase α subunit immunoreactivity after incubation with PGE₂ in hippocampal slices. Statistical analysis revealed that incubation with PGE₂ decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,10) = 6.29$; $p < 0.05$] (Fig. 2a), but did not alter α subunit immunoreactivity in these samples [$F(1,10) = 0.03$; $p > 0.05$] (Fig. 2b), suggesting that the currently reported decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity is not because of a reduction in enzyme content. In addition, we investigated whether incubation of hippocampal slices with PGE₂ would result in a decrease in plasma membrane levels of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, as decreased enzyme activity may arise from decreased protein targeting to the plasma membrane and/or increased protein endocytosis (Fisone *et al.* 1994, Bertorello *et al.* 2003). In our experimental conditions, PGE₂ did not modify the plasma membrane levels of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, as measured by surface biotinylation analysis [$F(1,6) = 0.02$;

$p > 0.05$] (Fig. 2d). Therefore the presently reported PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity seems not to be mediated by increased pump endocytosis.

As the biological actions of PGE₂ have been attributed to its ability to interact with plasma membrane EP receptors (EP1, EP2, EP3 and EP4) (Narumiya *et al.* 1999, Sugimoto & Narumiya 2007), we investigated the role of the different subtypes of PGE₂ receptors in the PGE₂-induced (1 μ M) decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity (Fig. 3). We found that incubation with a selective antagonist of EP1 receptors (SC-19220, 100 μ M) blunted PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,40) = 4.07$; $p < 0.05$] (Fig. 3a). We also found that the selective antagonists for EP3 and EP4 receptors L-826266 (1 μ M) and L-161982 (1 μ M) prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,16) = 9.94$; $p < 0.05$] (Fig. 3c) and [$F(1,16) = 4.53$; $p < 0.05$] (Fig. 3d), respectively. Conversely, incubating slices with increasing concentrations (0, 0.1, 1 or 10 μ M) of the EP2 receptor agonist butaprost induced a concentration-dependent increase of Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(3,24) = 4.29$; $p < 0.05$] (Fig. 3d). However, butaprost (1 μ M) did not blunt the PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,24) = 0.63$; $p > 0.05$] (Fig. 3e), suggesting that activation of EP2 receptors does not counteract PGE₂ actions on the other EP receptors.

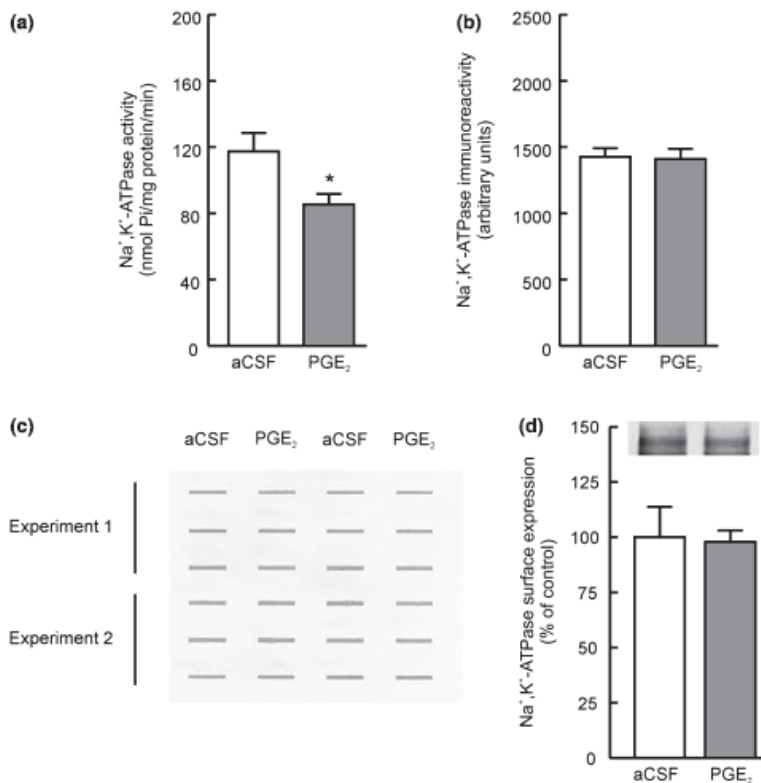


Fig. 2 Effect of PGE₂ (1 μ M) on (a) Na⁺,K⁺-ATPase activity and (b) on the immunoccontent of the α subunit of Na⁺,K⁺-ATPase of rat hippocampal slices. (c) A typical nitrocellulose membrane is shown. (d) Lack of effect of PGE₂ (1 μ M) on the cell surface expression of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit. Data are mean + SEM for $n = 8$ in each group, from four different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group.

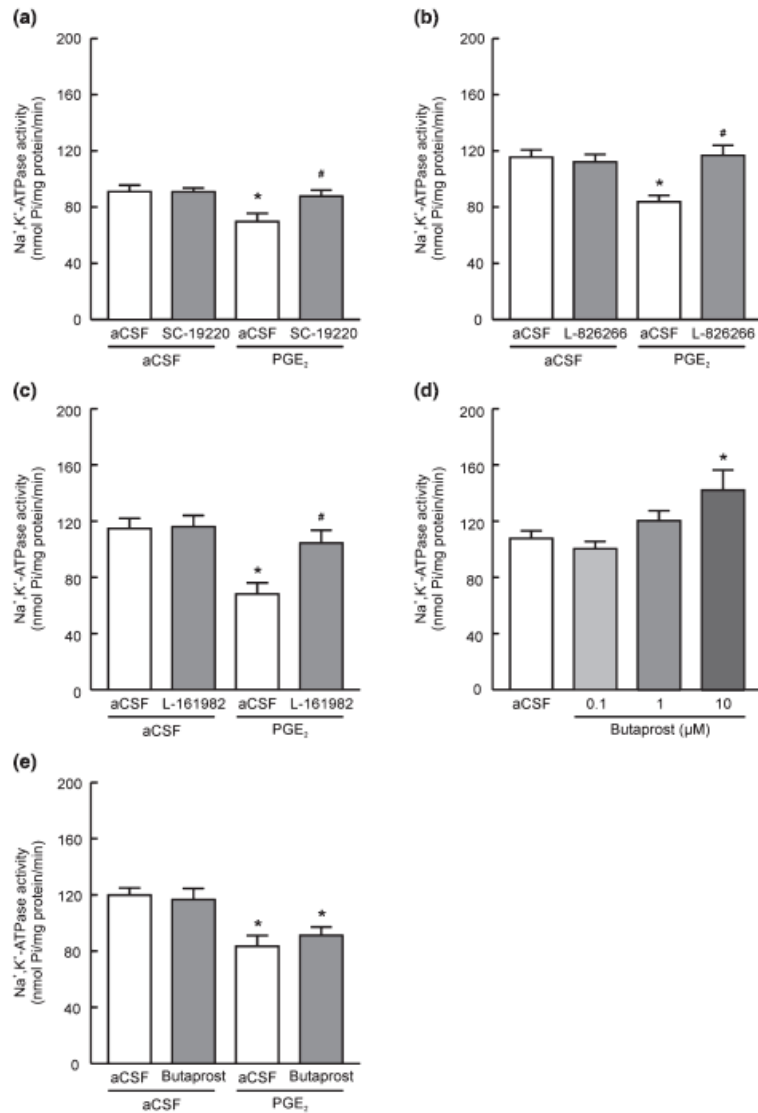


Fig. 3 Effect of EP1 (SC-19220, 100 μM, a), EP3 (L-826266, 1 μM, b) and EP4 (L-161982, 1 μM, c) receptor antagonists on the PGE₂-induced (1 μM) decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat hippocampal slices. It is also shown the effect of the EP2 agonist butaprost (0, 0.1, 1 or 10 μM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat hippocampal slices (d) and on the PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat hippocampal slices (e). Data are mean + SEM for $n = 5-11$ in each group, from 5 to 11 different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group. #Indicates a significant difference compared with PGE₂ group.

As PKA and PKC are major downstream kinases involved in EP1, EP3 or EP4 receptor signaling (Sugimoto & Narumiya 2007), and these kinases regulate Na⁺,K⁺-ATPase activity in the brain (Nishi *et al.* 1999, Cheng *et al.* 1999, Cheng *et al.* 1997b), we investigated whether they are involved in PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. Statistical analysis revealed that incubation with the PKA inhibitor H-89 (1 μM) prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,36) = 4.60$; $p < 0.05$] (Fig. 4). In addition, incubation with the PKC inhibitor GF-109203X (300 nM) also prevented PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(1,20) = 9.62$; $p < 0.05$] (Fig. 4). We also investigated whether incubation of hippocampal slices with PGE₂ would result in phosphorylation of the α subunit at the

Ser943. Interestingly, we found that incubation of hippocampal slices with PGE₂ significantly increased phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit at the Ser943 [$F(1,8) = 5.581$; $p < 0.05$] (Fig. 5).

To determine whether the PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity occurred *in vivo*, animals were injected with PGE₂ (1, 10 or 100 ng/2 μL, i.c.v.) and Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined in the hippocampus. In the present study we did not detect any effect of PGE₂ on the behavior of the animals. However, statistical analysis revealed that the i.c.v. injection of PGE₂ (100 ng/site) decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity by 25% in the hippocampus [$F(3,18) = 4.21$; $p < 0.05$] (Fig. 6), confirming the results obtained *in situ*.

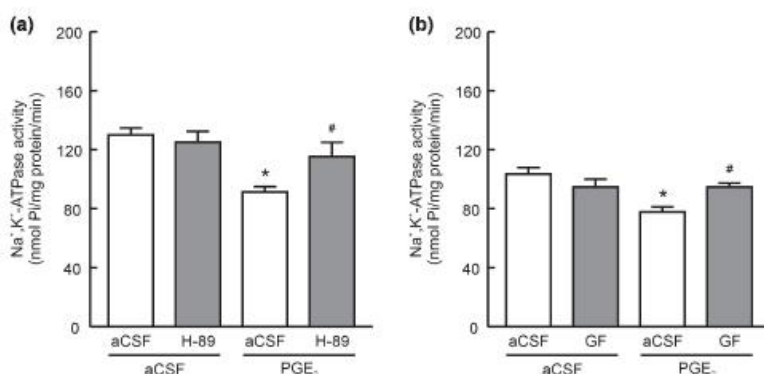


Fig. 4 Effect of the PKA inhibitor H-89 (1 μ M, a) or the PKC inhibitor GF-109203X (300 nM, b) on PGE₂-induced (1 μ M) decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean + SEM for $n = 6$ –10 in each group, from 6 to 10 different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group. #Indicates a significant difference compared with PGE₂ group.

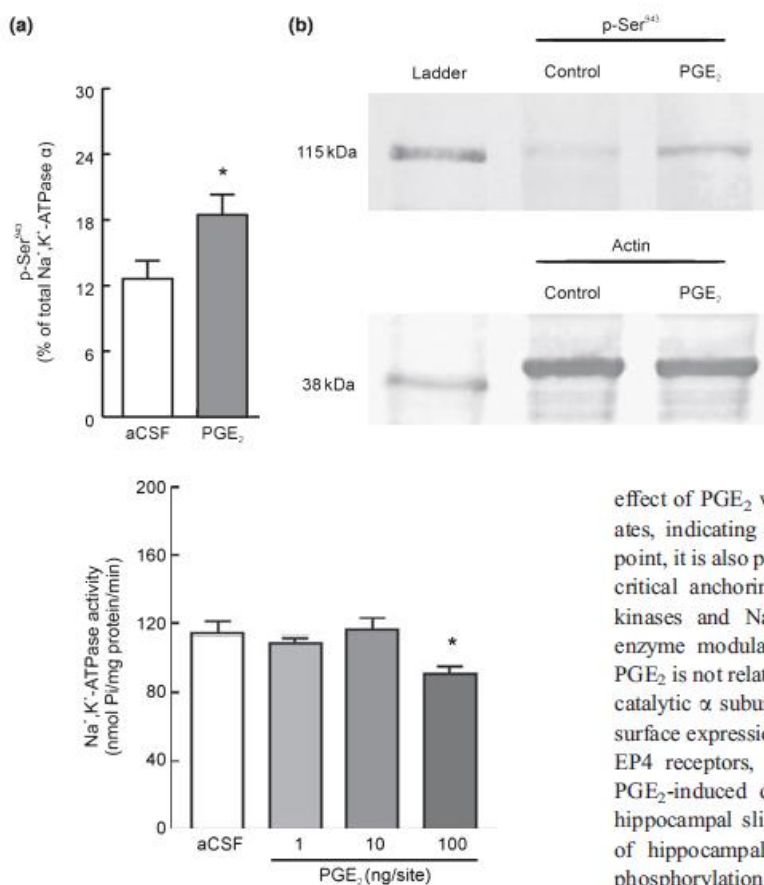


Fig. 5 Effect of PGE₂ (1 μ M) on the immunoccontent of the phosphorylated (Ser943) α subunit of Na⁺,K⁺-ATPase of rat hippocampal slices (a). A typical polyvinylidene difluoride membrane is shown (b). Data are mean + SEM for $n = 5$ in each group, from five different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group.

Fig. 6 Effect of the intracerebroventricular injection of PGE₂ (1, 10 or 100 ng/site) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus *in vivo*. Data are mean + SEM for $n = 5$ –6 in each group, from four different experiments. *Indicates a significant difference compared with control group.

Discussion

In the present study we showed that incubation with PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices, and that this effect is not α isoform-specific. The inhibitory

effect of PGE₂ was not observed in hippocampal homogenates, indicating that it requires intact cells. Regarding this point, it is also possible that tissue homogenizing may disrupt critical anchoring protein linkages between EP receptors, kinases and Na⁺,K⁺-ATPase, resulting in uncoupling of enzyme modulatory components. The inhibitory effect of PGE₂ is not related to a decrease in the immunoccontent of the catalytic α subunit of Na⁺,K⁺-ATPase or to a decreased cell surface expression of the enzyme. In addition, EP1, EP3 and EP4 receptors, and PKA/PKC activation are involved in PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices. Interestingly, we found that incubation of hippocampal slices with PGE₂ significantly increased phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit at the Ser943, a phosphorylation site which is critical for regulation of enzyme activity. On the other hand, incubation with the selective EP2 agonist butaprost increased Na⁺,K⁺-ATPase activity, but did not blunt the inhibitory effect of PGE₂. Importantly, we also showed that PGE₂ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity *in vivo*.

In the last decade a significant number of studies have proposed a role for COX-2 and PGE₂ in brain diseases. Increased COX-2 activity and PGE₂ levels have been associated with deleterious increases in cerebral excitability

which occurs in hypoxia/ischemia, seizures, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Chen & Bazan 2005b). Interestingly, the protection afforded by selective COX-2 inhibitors against NMDA-induced cell death *in vitro* and *in vivo* are reversed by a PGE₂ analog (Carlson 2003, Manabe *et al.* 2004), and the anti-convulsant effect of COX-2 inhibitor celecoxib against pentylenetetrazol-induced seizures is blunted by PGE₂ administration (Oliveira *et al.* 2008b), suggesting that PGE₂ may be largely responsible for the harmful effects of COX-2 over-activation. However, the mechanisms underlying the excitatory effects of this prostaglandin are not clear. It has been shown that PGE₂, but not PGD₂ or PGF_{2α}, increases firing frequency, excitatory post-synaptic potentials amplitude and temporal summation in slices treated with a COX-2 selective inhibitor (Chen *et al.* 2002). In addition, PGE₂ increases dendritic Ca²⁺ influx and decreases K⁺ currents in hippocampal neurons (Chen & Bazan 2005a). Moreover, it has also been demonstrated that PGE₂ increases excitatory post-synaptic potentials by increasing the probability of glutamate release (Sang *et al.* 2005), further suggesting that PGE₂ controls excitatory transmission in the brain. From the biochemical point of view, the currently reported PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity provides a possible mechanism by which facilitates excitatory neurotransmission, and is in full agreement with the previous reports that have proposed an excitatory role for this prostaglandin in various physiological and pathological conditions, such as learning impairment, cell death and seizures (Jamme *et al.* 1995, Lees *et al.* 1990, Moseley *et al.* 2007).

It is particularly interesting that two EP receptors implicated in PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity (EP1 and EP3) have also been implicated in neuronal cell death and seizures in other studies. In fact, pharmacological or genetic suppression of EP1 or EP3 receptor activity reduces neuronal death induced by NMDA, oxygen-glucose deprivation, transient middle cerebral artery occlusion and 6-hydroxydopamine and increases the latency for pentylenetetrazol-induced seizures (Ahmad *et al.* 2006a, Ahmad *et al.* 2007, Kawano *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2008a, Carrasco *et al.* 2007). Regarding the currently reported protective effect of EP4 receptor blockade on PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity, a review of currently available literature reveals an apparent contradictory finding, as it has been shown that EP4 receptor activation causes neuroprotection. In fact, the intracerebroventricular injection of the selective EP4 receptor agonist ONO-AE1-329 significantly reduces the neuronal cell death induced by the intrastriatal administration of NMDA (Ahmad *et al.* 2005). In addition, the incubation with 1-hydroxy-PGE1, an EP3/EP4 agonist with slight preference towards EP4 receptors, prevents the amyloid β-peptide-induced neurotoxicity, an *in vitro* model of Alzheimer's disease (Echeverria *et al.* 2005). However, current evidence also indicates that other signal transduction pathways may be recruited by the activation of these

receptors (Sugimoto & Narumiya 2007) and, thus, different outcomes can be found upon activation of EP4 receptors. For instance, although both EP2 and EP4 receptors are coupled to Gs proteins and increase cAMP levels, the protective effect of butaprost against Aβ exposure is blunted by the protein kinase A inhibitor RpcAMPS, whereas the protective effect of 1-hydroxy-PGE1 is not, implying differences between EP2 and EP4 receptor protective mechanisms (Echeverria *et al.* 2005), which may contribute to different outcomes following EP4 receptor modulation. In fact, we have shown that EP4 blockade has anti-convulsant effects, which is in agreement with our present results. However, more studies are necessary to evaluate the mechanisms underlying discrepancies found in studies with EP4 receptor ligands. Though a direct cause-effect relationship between PGE₂ accumulation, decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity and seizure and neurotoxicity susceptibility cannot be definitely established at this moment, given the reported high correlation between decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity and seizure duration (Figuera *et al.* 2006; Furian *et al.* 2007) and the determinant role of this enzyme for neuronal excitability, it is tempting to propose Na⁺,K⁺-ATPase as the link between inflammation and excitatory and excitotoxic conditions.

We also showed that the selective EP2 agonist butaprost increases Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampal slices. This result is in agreement with previous reports that activation of EP2 receptors reduces NMDA- and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and increases the latency for pentylenetetrazol-induced seizures (Ahmad *et al.* 2006b, Oliveira *et al.* 2008a, Carrasco *et al.* 2008). Accordingly, EP2 knockout mice subjected to ischemia present increased cerebral infarction compared with their wild counterparts (McCullough *et al.* 2004), corroborating the neuroprotective role of EP2 receptors. On the other hand, we found that butaprost did not blunt PGE₂-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity. These data suggest that activation of EP2 receptors does not counteract the action of PGE₂ on other EP receptors, which is in agreement with the view that PGE₂ increases brain excitability.

Studies on the functional effects of PKA/PKC-mediated phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase have demonstrated that activation of PKA and PKC decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity, as the PKA activators, such as forskolin and Sp-5,6-DCI-cBIMPS, as well as the PKC activator phorbol 12,13-dibutyrate significantly reduce Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons or COS cells (Cheng *et al.* 1999, Nishi *et al.* 1999, Cheng *et al.* 1997b). Our data indicate that PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity depends on PKA and PKC activation, as incubation with H-89 or with GF-109203X abrogated the effect of PGE₂. Moreover, we found that incubation of hippocampal slices with PGE₂ significantly increased phosphorylation of the α subunit at the Ser943, a phosphorylation site for PKA that is critical for regulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity (Cheng *et al.* 1997a, Cheng *et al.*

1997b, Fisone *et al.* 1994). For instance, phosphorylation of α subunit at this residue is associated with a decrease in enzyme activity which linearly correlates with the magnitude of phosphorylation (Cheng *et al.* 1997a). In addition, regulation of rat Na^+, K^+ -ATPase activity by PKC is modulated by the state of phosphorylation of Ser943 by PKA (Cheng *et al.* 1997b). As phosphorylation of Na^+, K^+ -ATPase at this residue is associated with a decrease in enzyme activity, it is reasonable to propose that PKA-mediated phosphorylation of the α subunit at the Ser943 is a critical mechanism underlying the PGE_2 -induced decrease in Na^+, K^+ -ATPase in rat hippocampus. These results, to some extent, agree with those from Chen and Bazan (2005a), who have shown that the PKA inhibitor H-89 and the PKC inhibitor chelerythrine fully prevent the PGE_2 -induced increase of excitatory post-synaptic potentials in hippocampal slices.

As phosphorylation of the α subunit at Ser943 may result in decreased enzyme activity by decreasing cell surface availability of the enzyme (Bertorello *et al.* 2003), we investigated whether incubation of hippocampal slices with PGE_2 decreased the plasma membrane levels of the α subunit of Na^+, K^+ -ATPase. In our experimental conditions, PGE_2 did not modify the plasma membrane levels of the Na^+, K^+ -ATPase α subunit, as measured by surface biotinylation. This finding, together with the finding that PGE_2 did not alter the total immunoccontent of the catalytic α subunit of Na^+, K^+ -ATPase, suggests that the currently reported PGE_2 -induced decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity is not mediated by changes in the number of enzyme molecules. Instead, these findings may indicate that the PGE_2 -induced decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity is related to a phosphorylation/dephosphorylation-mediated regulation of enzyme catalytic efficiency, as phosphorylation of the α subunit at Ser943 is associated with decreased substrate affinity (Fisone *et al.* 1994, Logvinenko *et al.* 1996).

While the currently reported PGE_2 -induced decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity may be important in pathological conditions, we cannot rule out a physiological role for it. For instance, PGE_2 regulates renal tubular sodium transport in the kidney, decreasing pump activity in proximal convoluted tubule and cortical collecting duct and increasing it in the distal convoluted tubule (Scherzer *et al.* 1992). Moreover, kidney and brain constitutively express COX-2, which preferentially produces PGE_2 (Ueno *et al.* 2005). Therefore, one might suggest that PGE_2 may also be a physiological regulator of Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus. However, this discussion is speculative in nature, and further studies are necessary to elucidate this point.

In summary, in this study we showed that incubation with PGE_2 decreases Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampal slices and that the i.c.v. injection of this prostaglandin decreases Na^+, K^+ -ATPase activity *in vivo*. The mechanisms involve EP1, EP3 and EP4 receptors, and PKA/PKC activation. We also found that PGE_2 increased phosphory-

lation of Ser943 at the α subunit, a critical residue for regulation of enzyme activity. The currently reported modulation of Na^+, K^+ -ATPase activity by PGE_2 support a mechanism by which inflammation may increase brain excitability and may represent a new target for drug development for neurological disorders in which inflammation plays a role.

Acknowledgements

Work supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant #301552/2007-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and National Institute of Health (Grant #1SC1GM081109-01 and MBRS-RISE Grant #1R25GM06592501A1). M.S. Oliveira is the recipient of a CAPES fellowship. A.F. Furian, J. Ferreira, J.B. Calixto and C.F. Mello are the recipients of CNPq fellowships. Authors acknowledge the Merck Frost (Kirkland, Quebec, Canada) that kindly supplied L-828266 and L-1616982.

References

- Ahmad A. S., Ahmad M., de Brum-Fernandes A. J. and Dore S. (2005) Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res.* **1066**, 71–77.
- Ahmad A. S., Saleem S., Ahmad M. and Dore S. (2006a) Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage. *Toxicol. Sci.* **89**, 265–270.
- Ahmad A. S., Zhuang H., Echeverria V. and Dore S. (2006b) Stimulation of prostaglandin EP2 receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J. Neurotrauma* **23**, 1895–1903.
- Ahmad M., Ahmad A. S., Zhuang H., Maruyama T., Narumiya S. and Dore S. (2007) Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J. Neuroimmunol.* **184**, 172–179.
- Aktan S., Aykut C. and Ercan S. (1991) Leukotriene C4 and prostaglandin E₂ activities in the serum and cerebrospinal fluid during acute cerebral ischemia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **43**, 247–249.
- Bertorello A. M., Komarova Y., Smith K., Leibiger I. B., Efendiev R., Pedemonte C. H., Borisy G. and Sznajder J. I. (2003) Analysis of Na^+, K^+ -ATPase motion and incorporation into the plasma membrane in response to G protein-coupled receptor signals in living cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1149–1157.
- Bradford M. M. (1976) 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.
- Carlson N. G. (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.
- Carrasco E., Casper D. and Werner P. (2007) PGE(2) receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE(2) neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3109–3117.
- Carrasco E., Werner P. and Casper D. (2008) Prostaglandin receptor EP2 protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-mediated low oxidative stress. *Neurosci. Lett.* **441**, 44–49.
- Cernak I., O'Connor C. and Vink R. (2001) Activation of cyclooxygenase-2 contributes to motor and cognitive dysfunction following diffuse traumatic brain injury in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **28**, 922–925.

- Charlemagne D., Orlowski J., Oliviero P., Rannou F., Sainte Beuve C., Swynghedauw B. and Lane L. K. (1994) Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *J. Biol. Chem.* **269**, 1541–1547.
- Chen C. and Bazan N. G. (2005a) Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **93**, 929–941.
- Chen C. and Bazan N. G. (2005b) Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **77**, 65–76.
- Chen C., Magee J. C. and Bazan N. G. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E₂ signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J. Neurophysiol.* **87**, 2851–2857.
- Cheng S. X., Aizman O., Nairn A. C., Greengard P. and Aperia A. (1999) [Ca²⁺]_i determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Physiol.* **518**, 37–46.
- Cheng X. J., Fisone G., Aizman O., Aizman R., Levenson R., Greengard P. and Aperia A. (1997a) PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. *Am. J. Physiol.* **273** C893–C901.
- Cheng X. J., Hoog J. O., Nairn A. C., Greengard P. and Aperia A. (1997b) Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *Am. J. Physiol.* **273**, C1981–C1986.
- Echeverria V., Clerman A. and Dore S. (2005) Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 2199–2206.
- Ellis C. K., Narayan R. K. and Ellis E. F. (1981a) GC/MS analysis of prostaglandins in ventricular cerebrospinal fluid from head injured humans. *Prostaglandins Med.* **7**, 157–161.
- Ellis E. F., Wright K. F., Wei E. P. and Kontos H. A. (1981b) Cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in cat cerebral cortex after experimental concussive brain injury. *J. Neurochem.* **37**, 892–896.
- Figuera M. R., Royes L. F., Furian A. F., Oliveira M. S., Fiorenza N. G., Frussa-Filho R., Petry J. C., Coelho R. C. and Mello C. F. (2006) GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiology of disease* **22**, 611–623.
- Fiske C. H. and Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–400.
- Fisone G., Cheng S. X., Nairn A. C., et al. (1994) Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K(+)-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 9368–9373.
- Fujisawa H., Kajikawa K., Ohi Y., Hashimoto Y. and Yoshida H. (1965) Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. *Jap. J. Pharmacol.* **15**, 327–334.
- Furian A. F., Figuera M. R., Oliveira M. S. et al. (2007) Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochemistry International* **50**, 164–171.
- Grisar T., Guillaume D. and Delgado-Escueta A. V. (1992) Contribution of Na(+),K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* **12**, 141–149.
- Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J. M. and Nouvelot A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na(+),K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* **7**, 333–337.
- Jung K. H., Chu K., Lee S. T., et al. (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.
- Jurkat-Rott K., Freilinger T., Dreier J. P., et al. (2004) Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology* **62**, 1857–1861.
- Kawano T., Anrather J., Zhou P., et al. (2006) Prostaglandin E₂ EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat. Med.* **12**, 225–229.
- Kempinski O., Shohami E., von Lubitz D., Hallenbeck J. M. and Feuerstein G. (1987) Posts ischemic production of eicosanoids in gerbil brain. *Stroke* **18**, 111–119.
- Kotilinek L. A., Westerman M. A., Wang Q., et al. (2008) Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain* **131**, 651–664.
- Lees G. J., Lehmann A., Sandberg M. and Hamberger A. (1990) The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **120**, 159–162.
- Li S. and Stys P. K. (2001) Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* **107**, 675–683.
- Logvinenko N. S., Dulubova I., Fedosova N., Larsson S. H., Nairn A. C., Esmann M., Greengard P. and Aperia A. (1996) Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K(+)-ATPase affects its conformational equilibrium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9132–9137.
- Loscher W. and Siemes H. (1988) Increased concentration of prostaglandin E-2 in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. *Epilepsia* **29**, 307–310.
- Manabe Y., Anrather J., Kawano T., Niwa K., Zhou P., Ross M. E. and Iadecola C. (2004) Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity. *Ann. Neurol.* **55**, 668–675.
- McCullough L., Wu L., Haughey N., Liang X., Hand T., Wang Q., Breyer R. M. and Andreasson K. (2004) Neuroprotective function of the PGE₂ EP2 receptor in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **24**, 257–268.
- Moseley A. E., Williams M. T., Schaefer T. L., Bohanan C. S., Neumann J. C., Behbehani M. M., Vorhees C. V. and Lingrel J. B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J. Neurosci.* **27**, 616–626.
- Nakayama M., Uchimura K., Zhu R. L., Nagayama T., Rose M. E., Stetler R. A., Isakson P. C., Chen J. and Graham S. H. (1998) Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 10954–10959.
- Narumiya S., Sugimoto Y. and Ushikubi F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193–1226.
- Navarro E., Romero S. D. and Yaksh T. L. (1989) CNS stimulation and PGE₂ release. III. Pentamethylenetetrazole-induced seizures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9**, 180–186.
- Nishi A., Fisone G., Snyder G. L., Dulubova I., Aperia A., Nairn A. C. and Greengard P. (1999) Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J. Neurochem.* **73**, 1492–1501.
- Oliveira M. S., Furian A. F., Rambo L. M., Ribeiro L. R., Royes L. F., Ferreira J., Calixto J. B. and Mello C. F. (2008a) Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E₂ receptors. *Neuroscience* **152**, 1110–1118.
- Oliveira M. S., Furian A. F., Royes L. F., et al. (2008b) Cyclooxygenase-2/PGE₂ pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res.* **79**, 14–21.
- Paxinos G. and Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Sang N., Zhang J., Marcheselli V., Bazan N. G. and Chen C. (2005) Postsynaptically synthesized prostaglandin E₂ (PGE₂) modulates

- hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE₂ EP2 receptor. *J. Neurosci.* **25**, 9858–9870.
- Scherzer P., Wald H., Rubinger D. and Popovtzer M. M. (1992) Indomethacin and sodium retention in the rat: role of inhibition of prostaglandin E₂ synthesis. *Clin. Sci. (Lond)* **83**, 307–311.
- Skou J. C. and Esmann M. (1992) The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 249–261.
- Stahl W. L. and Harris W. E. (1986) Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv. Neurol.* **44**, 681–693.
- Sugimoto Y. and Narumiya S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 11613–11617.
- Ueno N., Takegoshi Y., Kamei D., Kudo I. and Murakami M. (2005) Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 70–76.
- Wyse A. T., Streck E. L., Barros S. V., Brusque A. M., Zugno A. I. and Wajner M. (2000) Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* **11**, 2331–2334.
- Yu S. Y., Wu D. C., Liu L., Ge Y. and Wang Y. T. (2008) Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *J. Neurochem.* **106**, 889–899.

CAPÍTULO III

4 DISCUSSÃO

4. Discussão

Conforme descrito no item 1.5 Convulsão e epilepsia, da Introdução, epilepsia é uma condição neurológica crônica com incidência de 1 % na população em geral (Dichter et al., 2007), e que tem consequências importantes em termos de mortalidade e qualidade de vida da população afetada. O tratamento farmacológico das epilepsias é ineficaz para o controle das convulsões em aproximadamente 25% dos pacientes (Ben-Menachem et al., 2007), o que impacta em um alto custo social e financeiro para a sociedade. Assim, é importante a busca por novas drogas anticonvulsivantes, e o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões para o tratamento destas condições e melhoria da qualidade de vida dos pacientes afetados.

A associação entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de convulsões é conhecida de longa data, mas pouco se sabe dos mecanismos pelos quais mediadores inflamatórios facilitam as convulsões. Estudos do início deste século têm sugerido que mediadores da inflamação têm um papel importante na indução e/ou manutenção de convulsões (Vezzani and Granata, 2005). Neste contexto, foi mostrado que pacientes com epilepsia do lobo temporal e camundongos geneticamente susceptíveis a convulsões da raça EL apresentam aumento da expressão da COX-2 no cérebro (Okada et al., 2001; Desjardins et al., 2003). Além disso, camundongos transgênicos que superexpressam a COX-2 são mais susceptíveis as convulsões induzidas por cainato (Kelley et al., 1999), e inibidores seletivos da COX-2, como rofecoxib, nimesulida e celecoxib atenuam as convulsões induzidas por PTZ em ratos (Dhir et al., 2006b, a; Oliveira et al., 2008b). Neste contexto, estudos recentes têm implicado a PGE₂ como um efector importante da neurotoxicidade mediada pela ativação da COX-2. De fato, a inibição da COX-2 protege contra a excitotoxicidade induzida por

NMDA *in vitro* e *in vivo*, e este efeito é revertido pela administração de um análogo da PGE₂ (Carlson, 2003; Manabe et al., 2004). Além disso, a aplicação de PGE₂, mas não de PGD₂ ou PGF_{2α} aumenta a frequência de disparos e amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos em fatias de hipocampo de ratos incubadas com um inibidor seletivo da COX-2 (Chen and Bazan, 2005). Mais evidências de que a PGE₂ pode ser importante para o controle da excitabilidade no sistema nervoso central vêm dos estudos que mostraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ atenua as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (Oliveira et al., 2008b). Além disso, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das convulsões induzidas por este agente convulsivante (Oliveira et al., 2008b). Entretanto, uso por longo prazo de inibidores seletivos da COX-2 foi associado com vários efeitos adversos graves em humanos, incluindo um aumento no risco de acidentes cardiovasculares e infarto do miocárdio (Topol and Falk, 2004), e assim o uso de inibidores seletivos da COX-2 como adjuvantes na terapia anticonvulsivante poderia não ser uma alternativa segura. Nesse contexto, ligantes de receptores EP podem constituir uma alternativa mais segura ao uso de inibidores seletivos da COX-2 para diminuir as consequências da superativação da via COX-2/PGE₂ (FitzGerald, 2003; Dore, 2006).

Neste estudo, nós mostramos que o bloqueio de receptores EP1, EP3 ou EP4 atenua as convulsões induzidas por PTZ, constituindo as primeiras evidências na literatura sobre o efeito de ligantes exógenos de receptores EP em convulsões (Oliveira et al., 2008a). Assim, será traçado um paralelo entre nossos resultados e alguns estudos que mostraram efeitos neuroprotetores de ligantes de receptores EP, desde que algumas linhas de evidências sugerem que excitotoxicidade e convulsões compartilham mecanismos em comum (Bazan et al., 2002). Neste contexto, foi mostrado que a

supressão farmacológica ou genética do receptor tem efeitos neuroprotetores. De fato, a injeção i.c.v. dos antagonistas de receptores EP1 ONO8713 ou SC51089 reduz a morte neuronal induzida por injeção intraestriatal de NMDA, oclusão temporária da artéria cerebral média ou privação de oxigênio e glicose (Ahmad et al., 2006; Kawano et al., 2006). Além disso, camundongos nocaute para o receptor EP1 apresentam menos morte neuronal após injeção intraestriatal de NMDA ou oclusão temporária da artéria cerebral média do que os controles do tipo selvagem (Ahmad et al., 2006; Kawano et al., 2006), sugerindo que o bloqueio de receptores EP1 tem efeitos neuroprotetores. Similar ao caso do receptor EP1, também tem sido proposto que a ativação de receptores EP3 contribui para a excitotoxicidade (Ahmad et al., 2007). De fato, enquanto que a deleção genética do receptor EP3 atenua a morte celular induzida pela injeção intraestriatal de NMDA ou oclusão temporária da artéria cerebral média, a injeção i.c.v. do agonista de receptores EP3 ONO-AE-248 aumenta a morte celular nestes dois modelos de excitotoxicidade aguda (Ahmad et al., 2007). Nesse contexto, nossos resultados que mostram que o bloqueio de receptores EP1 ou EP3 possui efeito anticonvulsivante estão de acordo com a idéia atual sobre a participação destes receptores no fenômeno de excitotoxicidade.

Neste trabalho foi mostrado, também, que o agonista seletivo de receptores EP2 butaprost aumentou a latência para as convulsões induzidas por PTZ (Oliveira et al., 2008a). Este achado está de acordo com os estudos de McCullough et al. (2004), que mostrou um efeito neuroprotetor do butaprost contra morte celular induzida por NMDA e privação de oxigênio e glicose, e que camundongos nocauteados para o receptor EP2 apresentam maior índice de morte celular no córtex cerebral e outras estruturas subcorticais do que os camundongos controle do tipo selvagem. Além disso, a injeção i.c.v. de butaprost reduz a morte neuronal induzida pela injeção intraestriatal de NMDA

(Ahmad et al., 2006), reforçando a idéia de que o receptor EP2 tem papel neuroprotetor. Interessantemente, Ahmad et al. (2006) mostraram que o butaprost teve seu efeito protetor máximo em uma dose intermediária, mas não na dose mais alta. De modo similar, neste trabalho nós mostramos que a injeção de butaprost aumentou a latência para as convulsões induzidas por PTZ de maneira bifásica, com efeito máximo na dose intermediária de 0,1 nmol/sítio. Embora os mecanismos responsáveis por esta resposta bifásica da ativação do receptor EP2 sejam ainda desconhecidos, é importante notar que a ativação deste receptor pode se deletéria em alguns casos (Liang et al., 2005).

Contudo, os resultados obtidos do efeito anticonvulsivante do bloqueio dos receptores EP4 (Oliveira et al., 2008a), contrastam com os resultados disponíveis na literatura sobre a participação deste receptor em situações de excitotoxicidade, visto que tem sido mostrado que a ativação de receptores EP4 promove neuroproteção. De fato, a injeção i.c.v. do agonista seletivo destes receptores ONO-AE1-329 reduz a morte celular induzida pela injeção intraestriatal de NMDA (Ahmad et al., 2005). Além disso, a incubação com 1-hidróxi-PGE₁, um agonista EP3/EP4 com leve preferência para receptores EP4, previne a morte celular induzida por peptídeo amilóide A β 1-42 (Echeverria et al., 2005). Assim, seria esperado que o bloqueio de receptores EP4 facilitasse a ocorrência das convulsões induzidas por PTZ. Entretanto, nós mostramos que a injeção i.c.v. do antagonista seletivo de receptores EP4 L-161982 aumentou a latência para as convulsões induzidas por este agente convulsivante. Embora ambos receptores EP2 e EP4 estejam acoplados a proteínas Gs e aumentem os níveis de AMPc, tem sido sugerido que outras vias de transdução de sinal podem ser ativadas por receptores EP4 (Sugimoto and Narumiya, 2007) e, assim, diferentes resultados podem ser encontrados após a ativação de receptores EP2 e EP4. Por exemplo, o efeito protetor do agonista EP2 butaprost contra toxicidade induzida por peptídeo amilóide A β 1-42 é

revertido pelo inibidor de PKA RpCAMPS, ao passo que o efeito protetor do 1-hidróxi-PGE₁ contra este mesmo agente neurotóxico não é revertido por RpCAMPS, sugerindo diferenças entre os mecanismos protetores dos receptores EP2 e EP4 (Echeverria et al., 2005).

Considerando os mecanismos moleculares envolvidos na modulação das convulsões induzidas por PTZ, no presente trabalho nós mostramos que a PGE₂ e seus receptores modulam a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo (Oliveira et al., 2009), uma área cerebral envolvida na geração e manutenção das convulsões induzidas por PTZ (Brevard et al., 2006). A diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase encontrada no presente estudo atingiu as isoformas α 1, α 2 e α 3 de maneira similar e não foi vista em homogenatos, sugerindo que o efeito da PGE₂ é α isoforma-inespecífico e requer um sistema celular intacto. Além disso, a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ não foi devida a uma diminuição do conteúdo total ou presente na membrana da subunidade catalítica α . No que diz respeito aos receptores EP envolvidos, nós mostramos que antagonistas dos receptores EP1, EP3 e EP4 preveniram o efeito inibitório da PGE₂, ao passo que o agonista seletivo de receptores EP2 butaprost causou um aumento concentração-dependente na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Além disso, a incubação com PGE₂ causou um aumento nos níveis de fosforilação do resíduo de serina 943 da subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase, e inibidores da PKA e PKC preveniram a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂. Nesse contexto, considerando que as convulsões induzidas por PTZ aumentam os níveis de PGE₂ (Berchtold-Kanz et al., 1981) e uma diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase é encontrada no cérebro de ratos após as convulsões induzidas por este agente convulsivante (Oliveira et al., 2004), a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

induzida por PGE₂ poderia constituir um mecanismo pelo qual os receptores EP modulam as convulsões induzidas por PTZ.

É particularmente interessante mencionar que os receptores EP1, EP3 e EP4, implicados neste estudo na diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase por PGE₂, também participam de processos de morte neuronal e convulsões. Como mencionado anteriormente, a diminuição da atividade dos receptores EP1 ou EP3 protege da morte celular induzida por NMDA, isquemia e 6-hidróxi-dopamina, e atenua as convulsões induzidas por PTZ (Ahmad et al., 2006; Kawano et al., 2006; Ahmad et al., 2007; Carrasco et al., 2007; Oliveira et al., 2008a). Além disso, o bloqueio dos receptores EP4 também previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ em fatias de hipocampo, um resultado que também poderia ser utilizado para explicar os efeitos anticonvulsivantes do antagonista EP4 L-161982 (Oliveira et al., 2008a). Nesse contexto, dado o papel determinante da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase para o controle da excitabilidade neuronal em situações fisiológicas e patológicas, é tentador propor que a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ é um dos pontos comuns que ligam os fenômenos de inflamação e excitotoxicidade.

Estudos sobre o papel da fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase mediada por PKA e PKC demonstraram que os ativadores da PKA forskolina and Sp-5,6-DCI-cBIMPS, bem como o ativador da PKC forbol-12,13-dibutirato reduzem a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em neurônios (Cheng et al., 1997a; Cheng et al., 1999; Nishi et al., 1999). Nosso resultados mostraram que a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ depende da ativação dessas proteínas quinases, desde os inibidores da PKA H-89 e PKC GF-109203X preveniram o efeito da PGE₂ (Oliveira et al., 2009). Além disso, a incubação com PGE₂ causou um aumento nos níveis de fosforilação do resíduo de serina 943 da subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase, um sítio de fosforilação crucial para

regulação da atividade e expressão na membrana plasmática desta enzima (Fisone et al., 1994; Cheng et al., 1997a; Cheng et al., 1999). De fato, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase neste resíduo se correlaciona de maneira linear com atividade da enzima (Cheng et al., 1997b). Além disso a regulação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pela PKC é modulada pelo estado de fosforilação da serina 943 pela PKA (Cheng et al., 1997a). Assim, desde que a fosforilação da serina 943 está associada com diminuição da atividade da enzima, parece plausível propor que a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase neste resíduo é um mecanismo pelo qual a PGE₂ diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo de ratos. Em muitos tecidos, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de serina 943 resulta em endocitose da enzima, diminuindo seus níveis na membrana plasmática e conseqüentemente sua atividade (Teixeira et al., 2003). Contudo, neste trabalho nós não encontramos mudanças significativas na expressão da subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase na membrana plasmática após incubação com PGE₂. Este resultado, juntamente com o fato que a PGE₂ não altera o conteúdo total da subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase sugere que a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ não se deve a mudanças no conteúdo de enzima total ou presente na membrana plasmática. Por outro lado, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de serina 943 também pode alterar a atividade da enzima por alterar sua eficiência catalítica. De fato, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de serina 943 diminui a afinidade da enzima por seus substratos, e isto está associado a uma diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (Fisone et al., 1994; Logvinenko et al., 1996).

Enquanto que a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ tem implicações em processos patológicos, é possível hipotetizar que este efeito também possa ter implicações em situações fisiológicas. Nesse contexto, sabe-se que a PGE₂ regula o transporte tubular de Na⁺ nos rins, por diminuir a atividade da Na⁺,K⁺-

ATPase no túbulo proximal e ducto coletor cortical e aumentar a atividade da enzima no túbulo distal (Scherzer et al., 1992). Além disso, os rins e o cérebro são um dos poucos órgãos onde há expressão constitutiva da COX-2, que leva a produção preferencial de PGE₂ (Ueno et al., 2005). Entretanto, este ponto deve ser estudado mais a fundo, para determinar se a PGE₂ também é um regulador em situações fisiológicas da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo. Neste interim, é interessante citar que a administração intrahipocampal de celecoxib prejudica o aprendizado espacial, sugerindo um papel fisiológico para a PGE₂ no sistema nervoso (Sharifzadeh et al., 2005).

Em resumo, neste trabalho nós mostramos que as convulsões induzidas por PTZ são atenuadas por antagonistas de receptores EP1, EP3 ou EP4 ou um agonista de receptores EP2. Dado o papel chave da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase para regulação da excitabilidade neuronal, e considerando que o bloqueio dos mesmos receptores EP que possuem ação anticonvulsivante também previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂, é possível que este seja um dos mecanismos moleculares pelos quais a PGE₂ e seus receptores modulam as convulsões induzidas por PTZ.

A seguir propomos um esquema para ação pró-convulsivante da PGE₂ via receptores EP e Na⁺,K⁺-ATPase. O esquema é baseado nos resultados do presente estudo e em evidências da literatura. A ativação de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA é uma importante via de ativação da síntese de PGE₂ em neurônios (Bazan et al., 2002). O aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺ mediado por receptores NMDA causa ativação da PLA₂, que cataliza a hidrólise dos fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidônico. O ácido araquidônico é então convertido pela COX-2 em PGH₂, que é rapidamente utilizado por uma prostaglandina E sintase (PGES) para produção de PGE₂. Após atingir a fenda sináptica, a PGE₂ ativa os receptores EP (EP1, EP3 ou EP4) em neurônios e células gliais. A ativação dos

receptores EP promove ativação da proteína quinase A (PKA), que fosforila o resíduo de serina 943 (Ser⁹⁴³) da subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase, reduzindo sua atividade. A diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase causa desregulação dos processos de despolarização e repolarização aumentando a excitabilidade do sistema e facilitando o aparecimento e/ou propagação de convulsões.

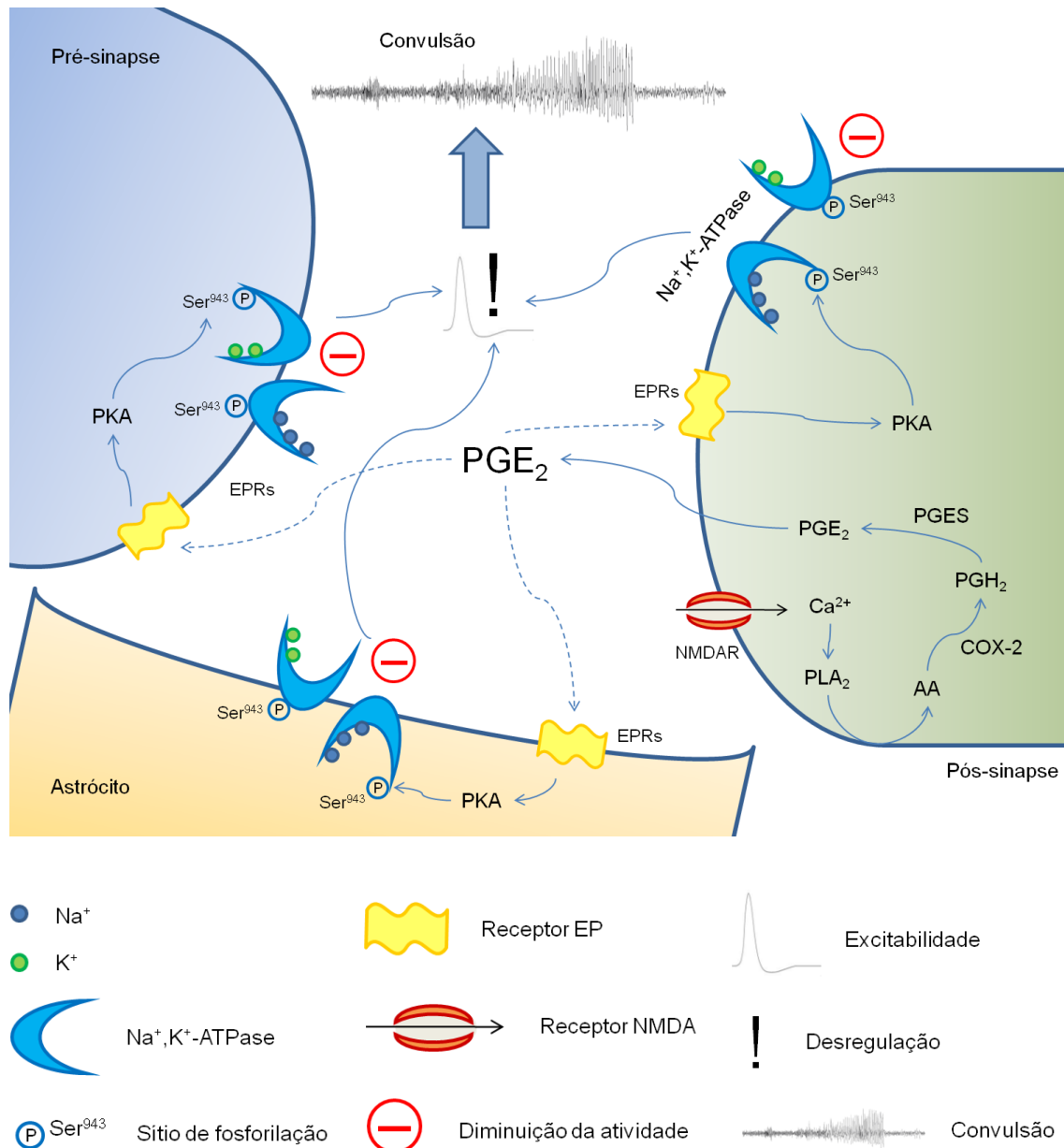


Figura 3: Esquema proposto para ação pró-convulsivante dos receptores EP via Na⁺,K⁺-ATPase.

5 CONCLUSÕES

5. Conclusões

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

5.1. Conclusões parciais

1. O antagonista de receptores EP1, SC-19220 (10 nmol/sítio; i.c.v.), atenua as convulsões induzidas por PTZ;
2. O agonista de receptores EP2, butaprost (0,1 nmol/sítio; i.c.v.), atenua as convulsões induzidas por PTZ;
3. O antagonista de receptores EP3, L-826266 (1 nmol/sítio; i.c.v.), atenua as convulsões induzidas por PTZ;
4. O antagonista de receptores EP4, L-161982 (750 pmol/sítio; i.c.v.), atenua as convulsões induzidas por PTZ;
5. A incubação com PGE₂ (1 ou 10 µM; 30 minutos) diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de ratos;
6. A incubação com PGE₂ (1 µM; 30 minutos) não altera a quantidade de moléculas de Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de ratos;
7. A incubação com PGE₂ (1 µM; 30 minutos) não altera a expressão da Na⁺,K⁺-ATPase na membrana plasmática em fatias de hipocampo de ratos;
8. A incubação com PGE₂ (1 µM; 30 minutos) aumenta a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de serina 943 em fatias de hipocampo de ratos;
9. O antagonista de receptores EP1, SC-19220 (100 µM; 30 minutos), previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ (1 µM; 30 minutos);
10. O agonista de receptores EP2, butaprost (1 µM; 30 minutos), não previne a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida por PGE₂ (1 µM; 30 minutos);

11. O antagonista de receptores EP3, L-826266 (1 μM ; 30 minutos), previne a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 (1 μM ; 30 minutos);
12. O antagonista de receptores EP4, L-161982 (1 μM ; 30 minutos), previne a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 (1 μM ; 30 minutos);
13. O inibidor de PKA, H-89 (1 μM ; 45 minutos), previne a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 (1 μM ; 30 minutos);
14. O inibidor de PKC, GF-109203X (300 nM; 45 minutos), previne a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 (1 μM ; 30 minutos).

5.2. Conclusão geral

Antagonistas de receptores EP1, EP3 e EP4 e um agonista de receptores EP2 atenuam as convulsões induzidas por PTZ. Este efeito anticonvulsivante pode estar associado a uma modulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PGE_2 .

6 PERSPECTIVAS

6. Perspectivas

Neste trabalho mostramos que os receptores EP modulam as convulsões induzidas por PTZ. Entretanto, ainda não se sabe se ligantes de receptores EP são capazes de modular as convulsões induzidas por outros agentes convulsivantes. Nesse sentido, uma das perspectivas para continuação deste trabalho é a determinação do papel dos receptores EP nas convulsões induzidas por outros agentes, como, por exemplo, o ácido caínico.

As convulsões induzidas por ácido caínico são consideradas um modelo importante de crises parciais com generalização secundária, apresentando características similares as crises desse tipo em humanos, incluindo farmacoresistência (Ben-Ari, 2000). Interessantemente, foi demonstrado que os níveis hipocâmpais de PGE₂ aumentam durante as convulsões induzidas por ácido caínico (Berchtold-Kanz et al., 1981; Baran et al., 1987), e que inibidores da COX-2 facilitam as convulsões induzidas por esse agente convulsivante (Baik et al., 1999), sugerindo que a PGE₂ teria um papel inibitório nesse tipo de convulsões. Estes resultados aparentemente contraditórios sugerem que o papel da via COX-2/PGE₂ em diferentes tipos de convulsões é complexo, e pode estar relacionado a contribuição diferencial de cada subtipo de receptor EP para as convulsões induzidas por PTZ ou ácido caínico. Assim, torna-se importante estudar o papel de cada subtipo de receptor EP nas convulsões induzidas por diversos agentes, visto que diferentes ligantes de receptores EP podem ser úteis para tipos específicos de convulsões.

7 REFERÊNCIAS

7. Referências

- Ahmad AS, Ahmad M, de Brum-Fernandes AJ, Dore S (2005) Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res* 1066:71-77.
- Ahmad AS, Zhuang H, Echeverria V, Dore S (2006) Stimulation of prostaglandin EP2 receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurotrauma* 23:1895-1903.
- Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Dore S (2007) Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol* 184:172-179.
- 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.
- Baran H, Heldt R, Hertting G (1987) Increased prostaglandin formation in rat brain following systemic application of kainic acid. *Brain Res* 404:107-112.
- Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turco EB (2002) What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res* 135:175-185.
- Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580-587.
- Ben-Menachem E, Chadwick DW, Moshé SL, Pellock JM, Perucca E, Pedley TA (2007) General Treatment Considerations. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, 2nd Edition (Engel J, Pedley TA, Aicardi J, Dichter MA, Moshé SL, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Berchtold-Kanz E, Anhut H, Heldt R, Neufang B, Hertting G (1981) Regional distribution of arachidonic acid metabolites in rat brain following convulsive stimuli. *Prostaglandins* 22:65-79.
- 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* 90:207-210.
- 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.
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340:227-241.
- 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 Ca²⁺-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.
- Brevard ME, Kulkarni P, King JA, Ferris CF (2006) Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 47:745-754.
- 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.
- Carrasco E, Casper D, Werner P (2007) PGE(2) receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE(2) neurotoxicity. *J Neurosci Res* 85:3109-3117.
- 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) Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77:65-76.
- Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH (1995) Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuroreport* 6:245-248.
- Cheng SX, Aizman O, Nairn AC, Greengard P, Aperia A (1999) $[Ca^{2+}]_i$ determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na^+,K^+ -ATPase. *J Physiol* 518 (Pt 1):37-46.
- Cheng XJ, Hoog JO, Nairn AC, Greengard P, Aperia A (1997a) Regulation of rat Na^+ - K^+ -ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *Am J Physiol* 273:C1981-1986.
- Cheng XJ, Fisone G, Aizman O, Aizman R, Levenson R, Greengard P, Aperia A (1997b) PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na^+ - K^+ -ATPase in response to beta-adrenergic hormone. *Am J Physiol* 273:C893-901.

- 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.
- 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 (2006a) Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in various animal models (bicuculline, picrotoxin, maximal electroshock-induced convulsions) of epilepsy with possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 44:286-291.
- Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK (2006b) Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1478-1485.
- Dichter MA, Hauser WA, Vinters HV, Pedley TA (2007) Epidemiology, Pathology and Genetics of Epilepsy. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, 2nd Edition (Engel J, Pedley TA, Aicardi J, Dichter MA, Moshé SL, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Dore S (2006) GPCR antagonists as an alternative to COX-2 inhibitors: a case for the PGE2 EP1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:458-460.

- 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.
- Echeverria V, Clerman A, Dore S (2005) Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur J Neurosci* 22:2199-2206.
- 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⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylene-tetrazole. *Neurobiol Dis* 22:611-623.
- Fisone G, Cheng SX, Nairn AC, Czernik AJ, Hemmings HC, Jr., Hoog JO, Bertorello AM, Kaiser R, Bergman T, Jornvall H, et al. (1994) Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269:9368-9373.
- FitzGerald GA (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:879-890.
- Fujino H, Regan JW (2003) Prostanoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase: a pathway to cancer? *Trends Pharmacol Sci* 24:335-340.
- Fujisawa H, Kajikawa K, Ohi Y, Hashimoto Y, Yoshida H (1965) Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. *Jpn J Pharmacol* 15:327-334.
- Furian AF, Figuera MR, Oliveira MS, Ferreira AP, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, Royes LF (2007) Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int* 50:164-171.

- Garay RP, Garrahan PJ (1973) The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells. *J Physiol* 231:297-325.
- 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.
- Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escueta AV (1992) Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-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.
- 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⁺,K⁽⁺⁾-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.
- Jurkat-Rott K, Freilinger T, Dreier JP, Herzog J, Gobel H, Petzold GC, Montagna P, Gasser T, Lehmann-Horn F, Dichgans M (2004) Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology* 62:1857-1861.
- Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71:511-535.
- Katoh H, Watabe A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Negishi M (1995) Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1244:41-48.
- 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 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.
- Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A (1990) The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 120:159-162.
- Li S, Stys PK (2001) Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107:675-683.

- Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K (2005) Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:10180-10187.
- Logvinenko NS, Dulubova I, Fedosova N, Larsson SH, Nairn AC, Esmann M, Greengard P, Aperia A (1996) Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase affects its conformational equilibrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9132-9137.
- 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.
- McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K (2004) Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:257-268.
- 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, Keinanen 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.
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform

- genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616-626.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226.
- Nelson DL, Cox MM (2002) Membranas Biológicas e Transporte. In: Lehninger Princípios de Bioquímica, 3ª Edição, Editora Sarvier.
- Nishi A, Fisone G, Snyder GL, Dulubova I, Aperia A, Nairn AC, Greengard P (1999) Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem* 73:1492-1501.
- 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.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF (2008a) Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 152:1110-1118.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416-426.

- Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavaleiro EA, Mello CF (2008b) Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79:14-21.
- Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML (2005) New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Research Reviews* 48:352-359.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition. New York: Academic Press.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- 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.

- Scherzer P, Wald H, Rubinger D, Popovtzer MM (1992) Indomethacin and sodium retention in the rat: role of inhibition of prostaglandin E2 synthesis. *Clin Sci (Lond)* 83:307-311.
- Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P (2003) 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.
- Sharifzadeh M, Tavasoli M, Naghdi N, Ghanbari A, Amini M, Roghani A (2005) Post-training intrahippocampal infusion of nicotine prevents spatial memory retention deficits induced by the cyclo-oxygenase-2-specific inhibitor celecoxib in rats. *J Neurochem* 95:1078-1090.
- 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.
- Singh G, Prabhakar S (2008) The effects of antimicrobial and antiepileptic treatment on the outcome of epilepsy associated with central nervous system (CNS) infections. *Epilepsia* 49 Suppl 6:42-46.
- Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23:394-401.
- Skou JC, Esmann M (1992) The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24:249-261.
- 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.

- 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.
- Soltoff SP, Mandel LJ (1984a) Active ion transport in the renal proximal tubule. II. Ionic dependence of the Na pump. *J Gen Physiol* 84:623-642.
- Soltoff SP, Mandel LJ (1984b) Active ion transport in the renal proximal tubule. III. The ATP dependence of the Na pump. *J Gen Physiol* 84:643-662.
- Stahl WL, Harris WE (1986) Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv Neurol* 44:681-693.
- 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.
- Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282:11613-11617.
- Tabata H, Tanaka S, Sugimoto Y, Kanki H, Kaneko S, Ichikawa A (2002) Possible coupling of prostaglandin E receptor EP(1) to TRP5 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 298:398-402.
- Teixeira VL, Katz AI, Pedemonte CH, Bertorello AM (2003) Isoform-specific regulation of Na⁺,K⁺-ATPase endocytosis and recruitment to the plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* 986:587-594.
- Therien AG, Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C541-566.

- Therien AG, Nestor NB, Ball WJ, Blostein R (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 271:7104-7112.
- Topol EJ, Falk GW (2004) A coxib a day won't keep the doctor away. *Lancet* 364:639-640.
- 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.
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395:281-284.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Velisek L (2006) Models of Chemically-Induced Acute Seizures. In: *Models of seizures and epilepsy*, 1st Edition (Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, eds). San Diego: Academic Press.
- 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.
- 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.
- Yoshida Y, Matsumura H, Nakajima T, Mandai M, Urakami T, Kuroda K, Yoneda H (2000) Prostaglandin E (EP) receptor subtypes and sleep: promotion by EP4 and inhibition by EP1/EP2. *Neuroreport* 11:2127-2131.
- Zhu P, Genc A, Zhang X, Zhang J, Bazan NG, Chen C (2005) Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. *J Neurosci Res* 81:817-826.