

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

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAérgico NAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
ELETRECEFALOGRAFÍAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS
PELA INJEÇÃO DE METILMALONATO NO VENTRÍCULO DE
RATOS**

CARLOS RICARDO MANECK Malfatti

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas-Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica**

Porto Alegre
2007

AGRADECIMENTOS

À minha família que, apesar de não estar próxima fisicamente, esteve sempre ao meu lado, acreditando neste momento.

À minha mãe que, apesar de não estar mais presente de corpo nesta vida, esteve e sempre estará presente em alma em nos nossos corações.

Ao meu pai, pelo exemplo de vida e dedicação a carreira de pesquisador e docente, foste modelo de inspiração na tentativa de superação dos momentos mais difíceis.

Ao professor Perry, pela sabedoria, acolhida no laboratório e oportunidade de aprendizado com toda a sua equipe de trabalho.

Ao Alexandre, irmão de profissão, fiel amigo e braço direito em todos os experimentos.

À Ingrid, pela mão amiga e competente nas etapas mais difíceis de nossa coleta de dados.

Aos amigos verdadeiros, obrigado pela força e incentivo.

Aos meus colegas de profissão na UNISC, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência para dedicar-me na execução desta tese.

Ao prof. Carlos Fernando de Mello, pela oportunidade, confiança, sabedoria, rigidez nos momentos decisivos e também um abraço nos comemorativos, a você, minha gratidão e desejo de alcançar um pouco de sua sabedoria e competência.

Agradeço a Flávia e a Lia, duas amigas que me ajudaram muito nas etapas iniciais e não menos importantes deste trabalho. Muito obrigado pela força e por acreditarem que era possível.

Ao prof. Clóvis Wammacher, pela competência, experiência e exemplos de vida passados durante uma disciplina fundamental e imperdível (Metodologia do Ensino em Bioquímica) no curso, bem recomendada pelo prof. Carlos Mello (orientador).

À minha amada Gabi, pela paciência, ajuda e compreensão pela ausência, justificada com a dedicação ao doutorado.

ABREVIATURAS

EIM	Erros inatos do metabolismo
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartato
GAD	Glutamato descarboxilase
NO [•]	Óxido nítrico
SDH	Sucinato desidrogenase
MDA	Ácido malondialdeído
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
CAT	Catalase
GSH-PX	Glutationa peroxidase
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GABA-T	GABA-Transaminase
PLP	Pirodoxal fosfato
TLE	Epilepsia de lobo temporal
PTZ	Pentilenotetrazol
PCT	Picrotoxina

Sumário

BREVIATURAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Capítulo I – Introdução	1
I.1. Acidemia Metilmalônica	1
I.2. O Sistema GABAérgico	6
I.2.1. Glutamato Descarboxilase	6
I.2.2 Papel da glutamato descarboxilase em patologias	11
I.2.3 Seqüenciamento dos aminoácidos presentes nos domínios da GAD-65 e GAD-67	16
I.2.4 Características do domínio N-terminal	17
I.2.5 Características do domínio C-terminal	14
I.2.6 Receptores GABAérgicos	15
I.2.7 Receptores GABAérgicos em doenças neurológicas e psiquiátricas	16
I.2.8 Regulação do receptor GABA_A após isquemia focal	17
I.2.9 Receptor GABA_A na epilepsia	21
I.3 Objetivos e Organização do Trabalho desta Tese	26
Capítulo II	27
MALFATTI CRM, Perry MLS, Scheigert ID, Muller AP, Pasquetti L, Rigo FK, Figuera MR, Garrido-Sanabria ER, Mello CF. Convulsions Induced by Methylmalonic Acid are Associated with Glutamic Acid Decarboxylase Inhibition in Rats: A Role for GABA in the Seizures Presented by Methylmalonic Acidemic Patients? Aceito para publicação na Neuroscience (2007).	
Capítulo III – Discussão Geral	66
III. Discussão Geral	74

Capítulo IV – Conclusões	72
V. Conclusões	73
IV.1 Conclusões Específicas	73
IV.2 Conclusão Geral	74
V. Referências Bibliográficas	75
ANEXO: Aceite do artigo pela Neuroscience	110

RESUMO

O ácido metilmalônico (MMA) é um agente convulsivante endógeno que se acumula na acidemia metilmalônica, um erro inato no metabolismo caracterizado por disfunções neurológicas severas, predispondo ao aparecimento de convulsão. O mecanismo responsável pelas convulsões induzidas pelo MMA envolve a ativação do receptor NMDA. O envolvimento GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA ainda não foi demonstrado. Desta forma, no presente estudo objetivou investigar o envolvimento de mecanismos GABAérgicos nas convulsões induzidas pelo MMA. Ratos adultos foram injetados (i.c.v.) com muscimol (46 pmol/1 μ l), baclofen (0.03, 0.1 and 0.3 μ mol/1 μ l), MK-801 (6 nmol/1 μ l), piridoxine (2 μ mol/ 4 μ l) ou salina (0.15 μ mol/1 μ l). Após trinta minutos, MMA (0.3, 0.1 and 3 μ mol/1 μ l) ou NaCl (6 μ mol/1 μ l, i.c.v.) eram injetados. Após estas injeções, os animais eram transferidos imediatamente para um campo aberto, sendo observado o aparecimento de convulsões. Após a avaliação comportamental, foi dosada a atividade glutamato descarboxilase (GAD) em homogeneizado de córtex cerebral, mensurando a quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ liberado do L-[^{14}C]-glutamato. As convulsões foram confirmadas pelo estudo eletrencefalográfico. O MMA induziu convulsões do tipo crônicas de forma dose-dependente e reduziu a atividade da GAD no córtex cerebral *ex vivo*. A atividade da GAD correlacionou-se negativamente com a duração das convulsões ($r=-0.873$, $P<0.01$), mas somente o MK-801 e a piridoxina reverteram à inibição da GAD pelo MMA. Estes resultados sugerem o envolvimento de mecanismos GABAérgicos nas convulsões induzidas pelo MMA, e que a inibição da GAD depende da ativação de receptores NMDA ou da proteção da enzima pela piridoxina. Por fim, o presente estudo propôs, de forma inovadora, o envolvimento do sistema GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA e o envolvimento dos receptores NMDA na falha da transmissão GABAérgica.

Palavras chave: receptores NMDA, GAD, acidemia metilmalônica, convulsão

ABSTRACT

Methylmalonic acid (MMA) is an endogenous convulsing compound that accumulates in methylmalonic acidemia, an inborn error of the metabolism characterized by severe neurological dysfunction, including seizures. The mechanisms by which MMA causes seizures involves the activation of the NMDA receptors, but whether GABAergic mechanisms are involved in the convulsions induced by MMA is not known. Therefore, in the current study we investigated the involvement of GABAergic mechanisms in the convulsions induced by MMA. Adult rats were injected (i.c.v.) with muscimol (46 pmol/1 μ l), baclofen (0.03, 0.1 and 0.3 μ mol/1 μ l), MK-801 (6 nmol/1 μ l), pyridoxine (2 μ mol/ 4 μ l) or physiological saline (0.15 μ mol/1 μ l). After thirty minutes, MMA (0.3, 0.1 and 3 μ mol/1 μ l) or NaCl (6 μ mol/1 μ l, i.c.v.) was injected. The animals were immediately transferred to an open field and observed for the appearance of convulsions. After behavioral evaluation, glutamate decarboxylase (GAD) activity was determined in cerebral cortex homogenates by measuring the $^{14}\text{CO}_2$ released from L-[^{14}C]-glutamic acid. Convulsions were confirmed by electroencephalographic recording in a subset of animals. MMA caused the appearance of clonic convulsions in a dose-dependent manner and decreased GAD activity in the cerebral cortex *ex vivo*. GAD activity negatively correlated with duration of MMA-induced convulsions ($r=-0.873$, $P<0.01$), in an individual basis. Muscimol, baclofen, MK-801 and pyridoxine prevented MMA-induced convulsions, but only MK-801 and pyridoxine prevented MMA-induced GAD inhibition. These data suggest GABAergic mechanisms are involved in the convulsive action of MMA, and that GAD inhibition by MMA depends on the activation of NMDA receptors or enzyme protection by pyridoxine. While in this study we present novel data about the role of the GABAergic system in MMA-induced convulsions, the central role of NMDA receptors in the neurochemical actions of MMA is further reinforced since they seem to trigger GABAergic failure.

Key Words: NMDA receptors, GAD, methylmalonic acidemia, convulsion

I. Introdução

I.1. Acidemia Metilmalônica

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo, causado por inibição ou pouca atividade da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (EC.5.5.99.2), uma enzima dependente de vitamina B₁₂, responsável pela conversão de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA, resultando em acúmulo de ácido metilmalônico (MMA), e de outros metabólitos secundários como propionato, metilcitrato, β-OH-propionato e cetonas de cadeia longas (Fenton et al., 2001).

Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade que se instala o distúrbio metabólico. Quando o quadro se instala precocemente (até 21 dias) o paciente geralmente vai a óbito (Fernandes et al., 1990).

O diagnóstico laboratorial da acidemia metilmalônica é realizado através do teste da p-nitroanilina, um resultado positivo indica a possibilidade de acidemia metilmalônica, sendo que o resultado final deve ser confirmado através da cromatografia gasosa preferivelmente acoplada à espectrometria de massa.

O quadro laboratorial é caracterizado principalmente por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, hiperglicinemia, neutropenia e trombocitopenia (Fenton & Roseberg, 1995). Os pacientes que sobrevivem (menos de 15 % no período de dois anos) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de alterações comportamentais e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Hoffmann et al., 1993). O tônus muscular apresenta-se geralmente comprometido, e a hipotonia se acentua após crises de descompensação metabólica (Fernandes et al., 1990).

Os pacientes podem apresentar alterações morfológicas no sistema nervoso central como edema da substância branca nas primeiras semanas, podendo evoluir para

um aumento no volume ventricular, desmielização e degeneração dos núcleos da base (Brismar & Ozand, 1994).

Em crianças normais e adultos, a excreção diária de MMA é menor que 0,04 mmol, enquanto que crianças com acidemia metilmalônica podem excretar 2,1 a 49 mmol deste metabólito em um período de 24 horas. As concentrações plasmáticas de MMA, que são quase indetectáveis em indivíduos normais, podem estar entre 0,22 a 2,9 mmol em pacientes (Fenton et al, 2001). O nível de MMA no sangue e no fluido cerebrospinal podem atingir 2,5 a 5 mM durante as crises de descompensação metabólica, e estes níveis podem aumentar ainda mais nas células neuronais (Hoffmann et al 1993).

Os pacientes com acidemia metilmalônica apresentam alterações fisiológicas, afetando o catabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (Wyse et al., 2000).

Tem-se demonstrado que o acúmulo de MMA inibe competitivamente a SDH e a β -OH-butirato desidrogenase cerebral *in vitro* (Dutra et al., 1993). Wajner et al., em 1992, observaram que este ácido reduz a produção de CO_2 e aumenta a produção de lactato pelo cérebro. O aumento de lactato pode contribuir para o dano cerebral, uma vez que, o acúmulo de ácido láctico tecidual podem provocar acidose grave, levando o pH para valores próximos a 6,0 (Siesjö, 1981). A diminuição do pH intracelular é capaz de inibir a recaptação de glutamato pela glia, mesmo havendo níveis normais de ATP e, com isso, contribuir para o dano neuronal excitotóxico (Swanson et al., 1995).

Pacientes com acidemia metilmalônica ou propiônica, em acidose, apresentam uma redução de até 70% da atividade da enzima citocromo oxidase (Hayasaka et al., 1982). Em função destes dados, tem sido postulado que o MMA possa causar interferência no metabolismo aeróbico celular, levando provavelmente a uma diminuição na produção de ATP.

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

O aumento na concentração celular de Ca^{++} leva à ativação de enzimas dependentes deste íon envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, incluindo calpaína (Brorson et al., 1995), fosfolipase C (Umemura et al., 1992), proteína quinase C (Rothman, 1992; Pavlakovic et al., 1995), calcineurina (Armstrong, 1989; Snyder & Sabatini, 1995) e a óxido nítrico sintetase, que produz NO^* (Snyder e Bredt, 1992). O NO^* parece interagir com radicais superóxido e formar peroxinitrito, que pode difundir-se para o meio intra, ou extracelular e, então, promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Beckman et al., 1990; Almeida et al., 1998).

Além destes mecanismos de lesão celular envolvendo a despolarização da membrana pós-sináptica, a depleção de ATP leva ao aumento na liberação de glutamato através de mecanismos dependente de cálcio e pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-sinapse (Madl & Burgesser, 1993). Ativando assim, os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e AMPA/Kainato.

Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular por mecanismos glutamatérgico, particularmente via ativação do receptor subtipo NMDA. Entre eles, podemos citar a rotenona, cianeto, oxiaminoacetato, 3-nitropropionato e malonato; estes

últimos inibidores da SDH, como o MMA (McDonald & Shoepf, 1993; Brouillet et al., 1994; Zeevalk et al., 1995; Behrens et al., 1995; Pavlakovic et al., 1995).

Na acidemia metilmalônica, pode-se destacar a ação do ácido metilmalônico na inibição da atividade da creatina quinase total e mitocondrial em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade e a prevenção deste efeito pela glutathiona reduzida (Schuck et al., 2004). A glutathiona também preveniu totalmente a ação inibitória do MMA sobre a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em membrana plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos tratados aguda e cronicamente. O que permite a conclusão de que grupos tiol ou outra demanda oxidativa podem ser responsáveis pelos efeitos desencadeados pelo MMA (Wyse et al., 2000).

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

O dano celular oxidativo, que ocorre pela formação de radicais livres, parece estar relacionado à patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica (Plaitakis & Constantakakis, 1993), Mal de Parkinson (Jenner, 1994; McNaught et al., 1995), Doença de Alzheimer (Jenner, 1994; Harris et al., 1995), Coréia de Huntington (Jenner, 1994; Lipton & Rosemberg, 1994; Ludolph et al., 1993; Burns,

1995), bem como em um considerável número de EIM, incluindo as acidemias orgânicas glutárica, propiônica e metilmalônica (Figuera et al., 1999, 2000, 2003; Royes et al., 2005; Wajer et al., 2003, Cechini et al., 2003).

Entre as evidências que mostram o envolvimento de espécies reativas em doenças neurodegenerativas, estão o aumento dos parâmetros do estresse oxidativo no cérebro, incluindo níveis aumentados de ácido malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-nonenal (HME) e a oxidação protéica de grupos carbonil e 3-nitrotirosina, assim como, concentrações reduzidas de antioxidantes não enzimáticos GSH e ascorbato, e das enzimas antioxidantes CAT e GSH-PX (Jeniner and Olanow, 1996; Lu et al., 1999; Pery et al., 2003).

I.1.1 Tratamento da acidemia metilmalônica

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

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

Estudos eletrofisiológicos e comportamentais mostram que o MMA induz convulsões principalmente por intermédio de uma ação glutamatérgica (de Mello et al., 1996, Brusque et al., 2001) e menos extensivamente dopaminérgica (Calabresi et al., 2001). Desta forma, até o presente momento pouco se sabe a respeito dos efeitos do MMA sobre outros sistemas de neurotransmissão, não menos importantes no desenvolvimento de convulsões, como o sistema GABAérgico. De fato, a regulação da neurotransmissão excitatória (glutamato) e inibitória (GABA) tem sido apontados como fundamentais para a gênese de episódios convulsivos e epilepsia. Inúmeros estudos suportam a idéia de que os episódios convulsivos podem ocorrer em função de uma falha na transmissão GABAérgica ou excesso na transmissão glutamatérgica (Scheyer, 1998; Treiman, 2001; Mody, 2004). Desta forma, a inibição da glutamato descarboxilase (GAD), a principal via de síntese de GABA no SNC, leva a depleção de GABA e redução do tônus GABAérgico e induz convulsões (Wood and Peesker, 1973; Arias et al., 1992, Salazar et al., 1994), enquanto que, a inibição da GABA-T, a enzima que metaboliza o GABA em ácido semialdeído succínico, aumenta os níveis de GABA e previne episódios convulsivos (Loscher and Horstermann, 1994).

I.2. O Sistema GABAérgico

I.2.1 Glutamato Descarboxilase

O GABA e a glutamato descarboxilase (GAD) foram descobertos no cérebro há aproximadamente 55 anos (Awapara et al., 1950; Roberts and Frankel, 1950), ao mesmo tempo em que existia um prolongado debate a respeito de mensageiros químicos envolvidos na transmissão sináptica (Bacq, 1975). Nesta época, a função do GABA no cérebro ainda permanecia por ser estabelecida. O GABA é atualmente conhecido como um transmissor predominantemente inibitório no cérebro, sendo encontrado, juntamente com a GAD, em terminais sinápticos e dendritos (Martin and Rinvall, 1993; Soghomonian

and Martin, 1998). Além disso, o GABA também está envolvido direta ou indiretamente na patogênese de muitas doenças neurológicas, como diabetes (Ueno, 2000), Huntington (Kunig et al., 2000), epilepsia (Baulec et al., 2001) e esclerose do corno de *Ammon* (Schwarzer et al., 1997). A principal via de síntese de GABA, envolve a GAD (Tillakaratne et al, 1995).

A estrutura molecular da GAD é constituída de 6 subunidades idênticas com 53 kDa (estrutura hexamétrica), com cada subunidade contendo um pirodoxal fosfato (PLP) por sítio ativo.

A enzima tem uma atividade ótima em pH ácido (4.0 e 4.5). Apesar do principal substrato para a *E coli* ser o L-glutamato, ela também descarboxila outros aminoácidos, como o g-metileno-DL-glutamato, *threo*-b-hidroxi-DL-glutamato e L-homocisteína sulfato (Ueno, 2000). No entanto, em células de mamíferos, a GAD catalisa exclusivamente a descarboxilação de L-glutamato para GABA (Ueno, 2000).

Nos humanos, a GAD apresenta dois genes regulados independentemente (Bu et al, 1992; Erlander et al, 1991), localizados um no cromossomo 2 e o outro no cromossomo 10, os quais, são responsáveis pela expressão diferenciada das duas diferentes isoformas da enzima, denominadas de GAD-65 e GAD-67 em diferentes regiões do cérebro (Esclapez et al., 1993, 1994; Feldblum et al., 1993; Mercugliano et al., 1992), o que possibilita a síntese de GABA em “pools” específicos, com funções diferentes (Martin and Rimvall, 1993).

Apesar de possuírem algumas diferenças no seqüenciamento de aminoácidos em sua estrutura, a GAD-65 e GAD-67 distribuem-se quantitativamente de forma similar nas diferentes regiões do cérebro, porém existe uma pequena supremacia na expressão da

GAD-65 em relação à GAD-67 na maior parte das regiões cerebrais (Sheikh et al., 1999).

A GAD-65 está predominantemente mais concentrada nos terminais nervosos e associada com vesículas sinápticas, enquanto que a GAD-67 é mais facilmente encontrada nos dendritos e em diferentes células do corpo. No cérebro, tanto a GAD-65 como a GAD-67, estão presentes como enzimas solúveis e associadas com membranas (Figura 1). Além disso, o cérebro contém heterômeros de GAD-65-GAD-67 (Sheikh and Martin, 1996). A diferença na localização subcelular das duas enzimas, associação com a membrana e formação de heterômeros, são importantes questões que servem para diferenciá-las enquanto função.

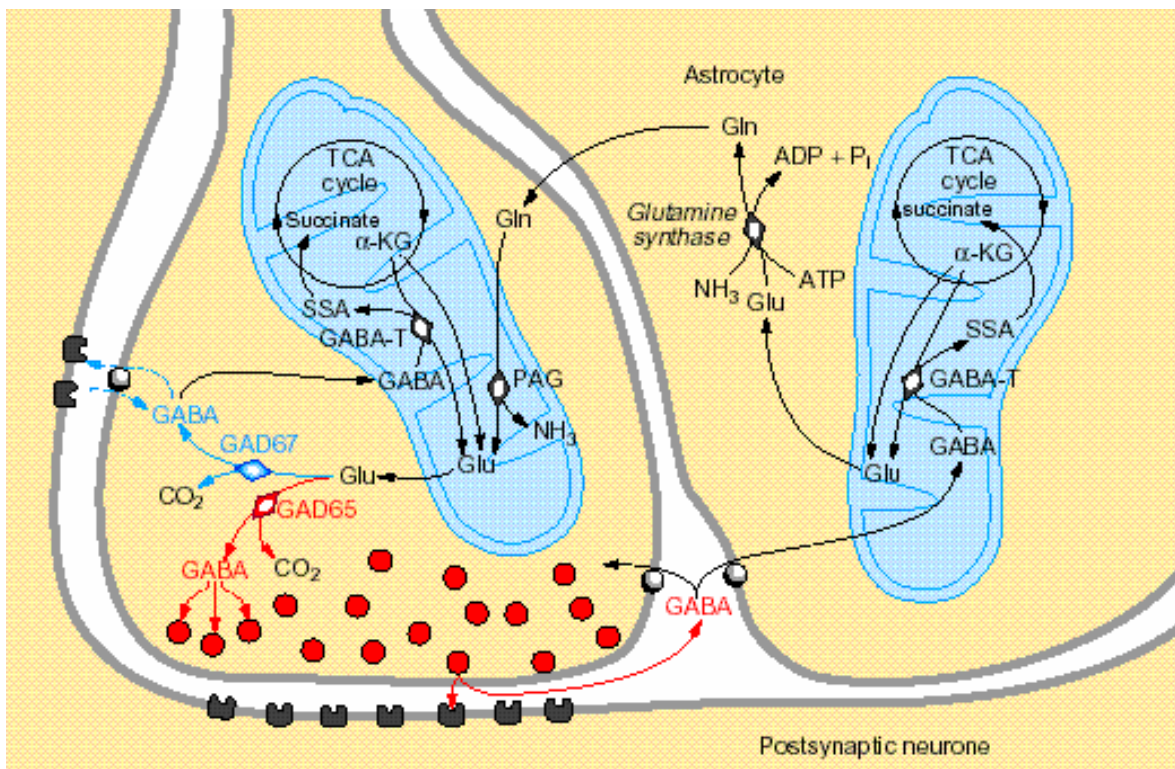


Figura 1. Síntese de GABA a partir da glutamato descarboxilase em diferentes *pools* no SNC. A GAD-65 está predominantemente mais concentrada nos terminais nervosos e associada com vesículas sinápticas (seta vermelha), enquanto que a GAD-67 (seta azul), é mais facilmente encontrada nos dendritos (Soghomonian and Martin, 1998)

As diferentes localizações intracelulares das isoenzimas da GAD podem ser

explicadas pela heterogeneidade da seqüência de aminoácidos na região N-terminal. Onde, a GAD-65 contém mais resíduos de cisteína dentro da região N-terminal do que a GAD-67. Dentro da região N-terminal da GAD-65 são encontrados 3 resíduos de cisteína palmitoilados, o que sugere uma afinidade maior com membranas celulares do que a GAD-67. Na medida em que, moléculas de GABA encontram-se empacotadas dentro de vesículas sinápticas em neurônios e microvesículas em células β no pâncreas, seria razoável assumir que moléculas de GAD estão associadas a componentes de membrana destas vesículas. Desta forma, independente da região N-terminal ser ou não palmitoilada, a GAD está envolvida em mecanismos de ancoramento nestas vesículas. Sabe-se também que muitos resíduos de serina na região N-terminal são susceptíveis à fosforilação, o que sugere o envolvimento da fosforilação no sistema de ancoramento da enzima na membrana ou na regulação de sua atividade (Ueno, 2000).

Ambas as formas da GAD requerem o cofator pirodoxal P (PLP) como coenzima para exercer suas atividades, sendo esta interação da GAD com o PLP um ponto central na regulação de sua atividade. No cérebro, metade da GAD não está associada com o PLP (apoGAD), se constituindo um "pool" de reserva de enzima inativa. Tal reserva, durante um característico estado de despolarização em sinaptosomas (Chen et al., 1998), pode ser ativada pelo seu cofator (holoGAD), fornecendo uma síntese adicional de GABA (Itoh and Uchimura, 1981). Além disso, sabe-se que a GAD-65 e GAD-67 possuem diferentes interações com o PLP. Experimentos com preparação de GAD-65 e GAD-67 por imunoprecipitação em cerebelo, indicam que a GAD-65 é mais responsiva para a ligação do PLP do que a GAD-67 (Erlander et al, 1991). A GAD-65 predomina na forma de apoGAD nas diferentes regiões do cérebro (Martin et al, 1991), o que representa, uma regulação mais expressiva do que a GAD-67 pelo PLP, além de apresentar-se mais

concentrada do que a GAD-67 em sinaptosomas, o que justifica, em parte, a sua grande abundância na forma de apoGAD (Rimvall and Martin 1994).

Conforme mostrado anteriormente, o ATP induz mudanças conformacionais em um ou mais resíduos de triptofano e tirosina na holoGAD, alterando estes para um estado menos móvel. Esta modificação pode estar relacionada com um aumento da desnaturação térmica da holoGAD em 2°C, conforme observado a partir da redução do conteúdo de holoGAD em 8 a 10% (percentual de redução da fluorescência) após a adição de ATP. Além disso, o ATP parece não agir diretamente no sítio catalítico da enzima, na medida em que ocorre somente uma pequena e não significativa redução da atividade da GAD após sua adição. Estudos cinéticos demonstraram que a holoGAD é formada a partir de duas etapas importantes, a primeira etapa é constituída de uma rápida reação, formando um complexo intermediário apoGAD-cofator, seguida da segunda etapa, mais lenta, onde ocorre uma mudança conformacional no complexo intermediário para formar a holoGAD. O ATP reduz em até 60% a taxa de conversão da primeira etapa (intermediária) para a segunda (formadora da holoGAD), reduzindo a quantidade de holoGAD formada. Além disso, foi demonstrado que o ATP reduz o nível de saturação da GAD pelo seu cofator na ordem de 60% em sinaptosomas (Miller and Walters, 1979) e 50 a 70% em extratos de cérebro (Miller and Walters, 1977). Estes dados sugerem que o ATP interage predominantemente com a apoGAD do que com a holoGAD, reduzindo a taxa de conversão da apoGAD para o complexo intermediário (apo-GAD-cofator) e conseqüentemente, reduz a formação de holoGAD. Desta forma, o ATP pode estar interferindo na Interação iônica do grupo fosfato do PLP com o resíduo de histidina presente na seqüência NPHK da apoGAD.

Albers and Brady (1959) mostraram que a atividade da GAD varia em função das diferentes regiões do cérebro. A atividade da GAD é maior no hipotálamo, mesencéfalo,

tálamo, cerebelo, córtex occipital, frontal e motor e menor nas estruturas subcorticais e da medula espinhal. Estudos mais recentes, mostraram uma predominância 95 a 100% de células GABAérgicas nas camadas superficiais do córtex cerebral (Jones, 1993; Peters & Kara, 1985).

1.2.2 Papel da glutamato descarboxilase em patologias

Há evidência de que a GAD participe da patogênese da diabetes tipo I (Ueno, 2000). De fato, as células β (pâncreas) expressam a GAD e produzem GABA. Nestas células, a GAD-65 foi identificada como um antígeno alvo para o anticorpo encontrado na circulação de pacientes com diabetes insulino-dependentes (Ueno, 2000), sucedendo antes do desenvolvimento dos sinais clínicos da doença. Anticorpos sensíveis para a GAD-65 e GAD-67 também são encontrados em pacientes com a síndrome de *Stiff* e também na epilepsia (Peltola et al., 2000; Solimena et al., 1988). Além disso, um número expressivo de estudos tem demonstrado uma correlação positiva entre a inibição da GAD cerebral com o aparecimento de convulsões, independentemente da concentração de GABA no cérebro (Meldrum, 1975; Tapia et al, 1975; Arias et al,1992). De fato, sabe-se que a infusão de GABA no córtex motor exerce uma ação anticonvulsivante (Brailowsky et al, 1987). Contudo, o excesso de infusão deste neurotransmissor reduz a atividade da GAD, e a sua retirada, após infusão crônica no cérebro, promove convulsões por deficiência de GABA em virtude de uma supressão da GAD (De Mello, 1984).

A GAD está diminuída em pacientes com doenças de Huntington e Parkinson (Rinne et al, 1974), duas doenças neurodegenerativas caracterizadas por lesões excitotóxicas do SNC, sugerindo que uma diminuição do tônus inibitório GABAérgico pode contribuir para o predomínio das ações do glutamato e o aparecimento de lesões excitotóxicas nestas patologias. Além disso, foi observado que mutações na sua estrutura

ou em certas subunidades de receptores GABA_A de camundongos causam aparecimento espontâneo de convulsões (Asada et al., 1996; Delorey et al., 1998).

Existem evidências para a perda de neurônios GABAérgicos a partir de estudos neuroquímicos com o uso de cainato como modelo de epilepsia de lobo temporal (TLE) e em tecido cerebral de humanos epiléticos, os quais, apresentaram uma atividade reduzida da GAD (Lloyd et al., 1986; Sperk et al., 1983). A partir de estudos imunocitoquímicos, Ribak et al. (1986) também mostrou um decréscimo de terminais GABAérgicos em um modelo de epilepsia focal, e perda de neurônios GABAérgicos em ratos que apresentavam *kindling* (Kamphuis et al., 1987). Em outro estudo, foi observado uma degeneração de neurônios positivos para GABA ou GAD no hipocampo de modelos animais com esclerose do corno de *Ammon*. Notavelmente, no hilo do giro denteado, uma subpopulação de neurônios GABAérgicos contendo o neuropeptídeo somatostatina como um co-transmissor é vulnerável tanto na epilepsia como também na isquemia cerebral (Sloviter, 1987).

De forma contrária, durante o estado epilético crônico em ratos, foi verificado um aumento na atividade da GAD e de marcadores para o GABA e GAD no hipocampo e interneurônios hipocampais (Marksteiner and Sperk, 1988). Desta forma, existe uma contradição em relação ao tônus inibitório durante o estado epilético e leva a crer que as sinapses GABAérgicas possam ser afetadas de forma heterogênea em diferentes regiões (estruturas) do cérebro epilético. Confirmando o que foi dito, na região do CA1 de ratos tratados com pilocarpina, o tônus GABAérgico inibitório é aumentado no soma de células piramidais, mas encontra-se reduzido nos dendritos (Cossart et al., 2001).

Embora as células do giro denteado exerçam principalmente um papel excitatório, elas também podem expressar a GAD e, conseqüentemente, sintetizar GABA (Sloviter et al.,

1996). Notavelmente, a expressão da GAD-67 encontra-se fortemente aumentada após convulsões epiléticas sustentadas (Scharzer and Sperk, 1995; Lehmann et al., 1996). Embora o aumento na transcrição da GAD-67 ocorra somente de forma transitória, o aumento da imunoreatividade para a GAD aparece de forma prolongada em ratos epiléticos (Scharzer and Sperk, 1995).

Existem linhas de evidência sugerindo uma interação entre espécies reativas e o funcionamento do sistema GABAérgico, na medida que espécies reativas podem prejudicar a função GABAérgica (Davis et al., 2001, Schloss, 2002) e predispor a um aumento da excitabilidade e aparecimento de episódios convulsivos. Além disso, tem sido demonstrado que a formação de radicais livres podem estar envolvidos nas convulsões induzidas por antagonistas GABAérgicos (de Oliveira et al., 2004).

Estudos anteriores mostraram o envolvimento de espécies reativas nas convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) (um antagonista GABAA), na medida em que antioxidantes como o ascorbato (Oliveira et al., 2004), tocoferol (Bashkatova et al., 2003), glutatona (Abe et al., 2000), melatonina (Bikjdaouene et al., 2003) preveniram estes episódios convulsivos. Recentemente, foi mostrado que α -tocoferol atenua episódios convulsivos e reduz a lipoperoxidação lipídica e carbonilação protéica induzida pelo PTZ (Ribeiro et al., 2005).

A GAD é particularmente sensível aos radicais livres e a sua inibição amplifica a epileptogênese induzida por FeCl_3 (Robitaille et al., 1995).

Por outro lado, Jayakumar et al. (1999) propôs um mecanismo envolvendo o metabolismo do GABA para explicar uma ação anticonvulsivante do NO. Neste estudo, o aumento da concentração de NO (precursor L-Arg) ocorreu concomitantemente com a redução da atividade da GABA-T no córtex cerebral de ratos. No entanto, não eram

observadas alterações na atividade da GAD e na concentração de glutamato. De forma interessante neste estudo, a picrotoxina (PCT) aumentava a atividade da GABA-T e reduzia os níveis de ambos GABA e NO, sem alterações na atividade da GAD.

Alterações na atividade da GAD também estão relacionadas com erros inatos do metabolismo, como a acidemia glutárica, na qual a atividade da GAD encontra-se diminuída (Leibel et al, 1980). Além destas diferenças em termos de interação das GADs com o PLP, foi mostrado que o nível de ATP pode regular a taxa de conversão de apoGAD em holoGAD, reduzindo assim a quantidade de holoenzima em situações de excesso de holoGAD (Chen et al., 2000).

I.2.5 Seqüenciamento dos aminoácidos presentes nos domínios da GAD-65 e GAD-67

A GAD-65 e GAD-67 são ambas constituídas de dois importantes domínios, possuindo diferenças no seqüenciamento dos aminoácidos que compõem estes domínios (Erlander et al., 1991). Um destes domínios é composto de 1-95 resíduos para a GAD-65 e 1-101 resíduos para GAD-67 em humanos, tendo somente 23% na homologia de seqüência. Este domínio, chamado de N-terminal, demonstra ser responsável pela localização subcelular e formação de heterômeros de GAD-65-GAD-67 (Dirk et al., 1995; Sheikh and Martin, 1996). O segundo domínio, chamado de C-terminal é composto de 95-585 resíduos para a GAD-65 e 100-594 na GAD-67 em humanos (Figura 2). O domínio C-terminal contém o sítio catalítico e apresenta-se de forma mais similar entre a GAD-65 e GAD-67 (73% de homologia de seqüência) do que no domínio N-terminal (Martin, 2000).

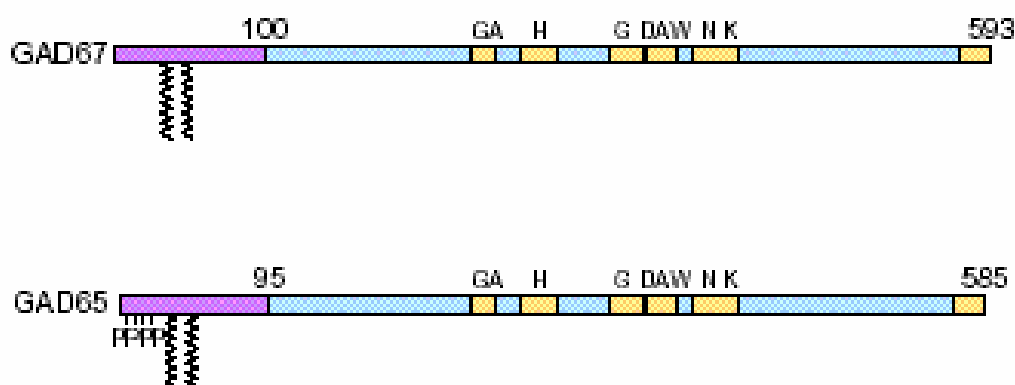


Figura 2. Domínio C-terminal para ambas as isoenzimas GAD-65 e GAD67. Este domínio contém o sítio catalítico e apresenta-se de forma mais similar entre a GAD-65 e GAD-67 (73% de homologia de sequência) (Martin, 2000).

1.2.6 Características do domínio N-terminal

O domínio N-terminal está envolvido com a associação da GAD-65 com as membranas (Dirkx et al., 1995). O mecanismo exato responsável pela ligação da GAD-65 com as membranas ainda permanece por ser esclarecido. Além disso, estudos mostram a real dependência da GAD-67 pela formação de heterômeros com a GAD-65 para associar-se com membranas. Nesta interação entre GADs, existe a participação determinante do domínio N-terminal da GAD-65, apesar de não se conhecer os resíduos específicos envolvidos neste processo (Martin, 2000).

O domínio N-terminal da GAD-65 está sujeito a três modificações pós-traducionais. A primeira envolve a palmitoilização de dois resíduos (Ribak et al., 1992; Babb et al., 1992) de cisteína (Shi et al., 1994). Anteriormente, esta modificação era interpretada como um fator imprescindível para ligação da GAD com as membranas, mas a descoberta de que o complexo GAD-membrana era inalterado quando dois resíduos de cisteína eram mudados para alanina, criou-se uma incerteza a respeito da função da palmitoilização neste processo. A segunda modificação está relacionada com a fosforilação dos primeiros quatro resíduos de serina pertencentes ao domínio N-terminal da GAD ligada na membrana (Namchuk et al., 1997). A função desta fosforilação ainda

permanece obscura, no entanto, parece não afetar a capacidade de associação a membranas ou propriedades cinéticas das GADs. Por último, a terceira modificação está relacionada à remoção da metionina e acetilação da penúltima alanina presentes no domínio N-terminal. Estas últimas alterações, provavelmente estão relacionadas com uma redução da sensibilidade da GAD para aminopeptidases (Martin, 2000).

Um grande corpo de evidências sugere que o domínio N-terminal localiza-se na superfície da GAD e algumas de suas porções são bastante flexíveis. Os resíduos 1-31, juntamente com os resíduos de serina 3, 6, 10 e 13 fosforilados, estão envolvidos mutuamente na associação da GAD-65 com as membranas, indicando que esta porção do domínio N-terminal encontra-se exposta. Foi mostrado que os resíduos 11-24 da GAD-65 encontram-se expostos na superfície da enzima e são suficientemente flexíveis para interagir com anticorpos (Sheikh and Martin, 1996). Além disso, a palmitoilação dos resíduos 30 e 45 de cisteína em ambas GAD-65 e GAD-67, indicam que estes resíduos poderão estar disponíveis na superfície e suficientemente flexíveis para interagir com enzimas envolvidas na palmitoilização ou sofrer ataque de enzimas proteolíticas (Martin, 2000). Além destes resíduos proximais, sítios localizados ao longo do domínio N-terminal, e desta forma mais distantes, também apresentam-se de forma exposta. Um bom exemplo disso é o resíduo 69 de arginina, o qual é particularmente vulnerável a um ataque proteolítico por tripsina (Martin, 2000).

I.2.7 Características do domínio C-terminal

A seqüência de aminoácidos presentes no domínio C-terminal fazem parte do sítio catalítico da GAD (Erlander et al., 1991 in Martin, 2000). Inicialmente, esta interpretação era confirmada pela presença de uma seqüência de resíduos NPHK, o qual marca a

ligação de uma base de Schiff com o cofator PLP. Com base em estruturas semelhantes, tem-se conseguido definir em maiores detalhes a ligação do PLP no domínio C-terminal. Isto se torna possível em virtude da GAD pertencer a uma super-família de enzimas dependentes pelo PLP (Martin, 2000).

O domínio C-terminal, é composto por dois domínios funcionais. O sítio ativo das GADs, também são compostos por dois domínios funcionais: um chamado de domínio longo, o qual contém o cofator ligado, e outro de curto, que não interage diretamente com o cofator (Martin, 2000).

1.2.8 Receptores GABAérgicos

Os receptores GABAérgicos podem ser classificados em ionotrópicos (quando ativados aumentam a condutância da membrana nos neurônios) ou metabotrópicos (acoplar a proteína G). Além disso, os receptores GABAérgicos são classificados em GABA_A e GABA_B, o quais diferenciam-se em virtude do primeiro ser ionotrópico e o segundo metabotrópico.

Estes receptores são formados por cinco subunidades, as quais servem de locais para a ligação (no canal iônico) de diferentes moduladores, como o GABA, muscimol, benzodiazepínicos, barbiturados, picrotoxina e também para os esteróides anestésicos. A partir de clonagem, identificou-se cinco domínios (α , β , γ , δ e ρ) e suas múltiplas isoformas. Dentro deste complexo, localiza-se o canal de cloreto, sendo este aberto a partir da ação dos diferentes ligantes (Hill e Bowery, 1981).

A ativação do receptor GABA_A induz aumento da condutância iônica do íon Cl⁻ com conseqüente hiperpolarização da membrana neuronal, o que acarreta em um aumento no limiar necessário para que os neurotransmissores excitatórios despolarizem a

membrana para gerar um potencial de ação (Paul, 1995).

Os receptores GABA_B são acoplados a proteínas G e alteram indiretamente a permeabilidade iônica da membrana e conseqüentemente a excitabilidade neuronal (Hill e Bowery, 1981). Estes receptores quando ativados por agonistas podem diminuir a condutância de Ca²⁺ e inibir a produção de AMPc através de um mecanismo mediado por proteínas G. Ambos os receptores GABA_A e GABA_B localizam-se tanto nos neurônios pré-sinápticos quanto nos pós-sinápticos, sendo também ambos considerados heterogêneos (Johnston, 1996).

Existe uma forte evidência para um envolvimento deste receptor (GABA_BR) mediando neurotransmissão durante convulsões epiléticas. O receptor GABA_BR encontra-se funcionalmente ativo sob duas formas, GABA_BR1 e GABA_BR2 (Kaupmann et al., 1998; Kuner et al., 1999; Couve et al., 2000) e podem atuar tanto na pré como na pós-sinapse (Couve et al., 2000). Sua principal função na pré-sinapse envolve a inibição da liberação de neurotransmissores, como glutamato ou GABA. Dependendo da situação, poderá estimular uma supressão da ação de neurotransmissores excitatórios ou inibitórios. Em pacientes, o baclofen (agonista GABA_BR) pode exercer uma ação espasmolítica ou ainda provocar convulsões, dependendo da dose administrada (Kofler et al., 1994). Além destes receptores, existem outros denominados GABA_C, GABA_{NANB} (“não A, não B”) e receptores clonados de retina (Johnston, 1996).

O receptor GABA_A é bloqueado pelo antagonista específico bicuculina, enquanto que o receptor GABA_B é bloqueado pelo baclofen (Hill e Bowery, 1981).

Existem diferentes agonistas e antagonistas para os receptores GABA_A e GABA_B,

os quais podem ser verificados na tabela 1.

Tabela 1. Compostos que atuam nos receptores GABAérgicos.

Agonistas GABA_A (Endógenos)	Antagonistas GABA_A (Competitivos)
GAB _A , GABO _B , Ácido imidazol-4-acético, β-Alanina, Taurina,	Bicuculina, (+)-Hidrastina, SR95531, Pitrazepina, Benzil-Penicilina, (+)-Tubocucarina, Securinina
Agonistas GABA_A (Exógenos)	Antagonistas GABA_A (Não-Competitivos)
Muscimol, THIP, Isoguvacina, ZAPA, (+)-TACP, Pentobarbitona	Picrotoxina, Ácido δ-Guanidinovalérico, Cunaniol, Sulfato de Dopamina, Norfloxacina, Furosemida, Enoxacina, Dimeflina, Pentilenotetrazol
Agonistas Parciais GABA_A	Agonistas GABA_B (exógenos)
4-PIOL, Tio-THIP	Saclofen, Baclofen

Fonte: Adaptado de Johnston (1996).

1.2.9 Receptores GABAérgicos em doenças neurológicas e psiquiátricas

A degeneração de neurônios GABAérgicos representa um sinal clínico (marcador) da doença de Huntington. Nas regiões do núcleo caudato e putamen, esta degeneração é acompanhada por uma profunda redução nos sítios de ligação para benzodiazepínicos e subunidades do receptor GABA_A, o que corresponde claramente uma perda de neurônios GABAérgicos (Kunig et al., 2000 revisão Fritschy, 2003). Por outro lado, na região do globo *pallidus*, foi verificado um aumento na concentração de receptores GABA_A, o que sugere um efeito compensatório. O ácido quinolínico induz lesões no estriado (modelo de Huntington) com conseqüentes aumentos na expressão da subunidade β2/3 do receptor GABA_A na substância *nigra* (Brickell et al., 1999). Ainda neste mesmo estudo, a expressão de receptores GABA_A ocorreu de forma muito rápida (2 horas) após a injeção

do ácido quinolínico, sendo que, normalmente deveria ocorrer ao longo dos meses (> 15 meses). Desta forma, ao mesmo tempo em que o aumento do número de receptores pós-sinápticos GABA_A podem representar uma resposta compensatória para a perda da aferência GABAérgica, uma resposta semelhante poderá ocorrer em função da perda de terminais glutamatérgicos (Fritschy & Brunig, 2003).

A injeção intraestriatal de malonato (um inibidor reversível da succinato desidrogenase e conseqüentemente do complexo II da cadeia de transporte de elétrons) causou uma redução nas concentrações de ambos GABA e dopamina no estriado. Além disso, o bloqueio do transportador de GABA (NO711) atenuou significativamente a perda de GABA, mas não a de dopamina. A infusão de muscimol (agonista GABA_A), picrotoxina (antagonista GABA_A) ou saclofen (antagonista GABA_B), não modificou a perda estriatal de dopamina e GABA verificada após a infusão de malonato. Ainda neste mesmo estudo, a associação de malonato com NO711, atenuou significativamente a perda de GABA nas regiões middle e dorsal do estriado, sendo estatisticamente diferente dos animais tratados somente com malonato (Zeevalk et al., 2002). Estes dados sugerem que o bloqueio do transportador de GABA durante inibição do metabolismo mitocondrial (inibição do complexo II) proporciona um mecanismo protetor para neurônios GABAérgicos. Sendo assim, o bloqueio do transportador de GABA, usado como uma estratégia farmacológica no tratamento de epilepsia em humanos, também poderá ser benéfico no tratamento para condições patológicas que envolvem inibição energética, como isquemias, Huntington, acidemia metilmalônica, acidemia glutárica, acidemia propiônica, entre outras.

1.2.10 Regulação do receptor GABA_A após isquemia focal

A isquemia focal no cérebro induz a uma série de mudanças na excitabilidade neuronal em diferentes regiões do cérebro (Hagemann et al., 2000 in revisão Fritschy,

2003). Estas modificações no padrão de excitabilidade, ainda não estão bem esclarecidas se ocorrem para compensar uma deficiência funcional ou fazem parte de uma plasticidade neuronal que envolve um mecanismo restaurativo. A respeito do receptor GABA_A, foram observadas mudanças em suas diferentes subunidades como decorrência do processo isquêmico (oclusão de artéria cerebral) nos hemisférios cerebrais *ipsi* e contralateral (Redecker et al., 2002 in revisão, 2003). Ainda neste mesmo estudo, foram encontradas reduções (ambos os hemisférios) nas subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, e $\gamma 2$ após 30 dias do processo isquêmico, e na subunidade $\alpha 3$ ocorria somente um aumento contralateral ao lado isquêmico. Estas mudanças no receptor GABA_A não são restritas para o neocórtex, mas ocorrem também no hipocampo e tálamo, indicando que a isquemia focal provoca mudanças em regiões adjacentes ao processo isquêmico, provocando desta forma alterações nos receptores GABA_A em diferentes regiões do cérebro. Inexplicavelmente, estas alterações podem ser prevenidas pela simples injeção de MK-801, um antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), durante a indução da lesão.

1.2.11 Receptor GABA_A na epilepsia

Existem evidências genéticas apontando para mutações nas subunidades $\gamma 2$ e $\alpha 1$ dos receptores GABA_A decorrentes da epilepsia idiopática em humanos com histórico de convulsões febris (Baulec et al., 2001). Além disso, Mutações semelhantes também foram encontradas nas subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 2$ em receptores recombinantes de “*xenopus oocytes*”, os quais apresentavam uma reduzida corrente GABAérgica. Neste estudo, o efeito potencializador causado pelo diazepam não foi afetado. Em outro estudo, foram verificadas mutações na subunidade $\gamma 2^{R43Q}$ sem haver modificações para a ligação do

GABA nos receptores recombinantes para as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, no entanto, ocorreu uma supressão do efeito potencializador causado pelo diazepam (Wallace et al., 2001). Além destas mutações, também foram verificadas alterações genéticas na subunidade $\alpha 1^{A322D}$ em receptores GABA_A de uma família portadora de epilepsia autossômica mioclônica juvenil dominante (Conette et al., 2002). No entanto, a maneira pela qual estas mutações contribuem para a convulsão, ainda não foram elucidadas em detalhes. Além disso, existe a possibilidade destas modificações na expressão de receptores GABA_A estarem relacionadas a outras formas de epilepsia, conforme demonstrado anteriormente em roedores portadores de TLP com esclerose hipocampal (Duncan, 1999; Olsen et al., 1999; Coulter, 2001; Treimann, 2001). Em pacientes, a perda extensiva de neurônios na região CA1, a qual é uma característica da esclerose hipocampal, é acompanhada por decréscimos no *binding* para a benzodiazepina (Savic et al., 1988; Debets et al., 1997). Estudos imunocitoquímicos com antígenos específicos de acordo com diferentes subunidades do receptor GABA_A, revelaram uma intensa perda de neurônios acompanhada de alterações subcelulares na distribuição dos receptores GABA_A em tecido epilético (Lomp et al., 2000). Neste estudo, foram verificados aumentos na imunoreatividade para as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ no soma e dendritos apicais das células granulares do giro dentado, além de uma aparente translocação da subunidade $\alpha 3$ da região somática para o dendrito de células piramidais da região do CA2. Alterações na expressão de subunidades do receptor GABA_A têm sido verificadas em diferentes modelos animais, com uma grande convergência de resultados. Em ratos com convulsão crônica gerada a partir da injeção de pilocarpina (agonista muscarínico) ou de cainato (agonista glutamatérgico), tem sido mostrado um aumento na expressão das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ (Schwarzer et al., 1997; Brooks et al., 1998; Fritschy et al., 1999).

No entanto, as convulsões induzidas por cainato ou pilocarpina não mimetizam por completo o padrão de convulsão experimentada por pacientes com TLP. Além disso, o padrão de perda neuronal, em modelos animais, é significativamente diferente do reportado em estudos neuropatológicos de esclerose hipocampal em humanos. Estas limitações são em parte superadas pelo uso de modelos de TLP em camundongos, onde existe a ocorrência de convulsões espontâneas, induzidas a partir da injeção unilateral de cainato dentro do hipocampo dorsal (Bouilleret et al., 1999; Riban et al., 2002). Nestes modelos, as células granulares do giro denteado encontram-se hipertróficas e com uma proeminente dispersão. Em uma análise do giro dentado epiléptico de camundongos, foi encontrado aumento na expressão das subunidades a1, a2, a5 e g2 (Bouillet et al., 2000), com correspondentes aumentos no tamanho e densidade de *clusters* pós-sinápticos (Knuesel et al., 2001). Estes resultados claramente sugerem uma formação de novas sinapses GABAérgicas, refletindo possivelmente na formação de axônios GABAérgicos no giro denteado em neurônios epilépticos. Estas modificações, consideradas aberrações, podem ser fatores determinantes para a epilepsia de lobo temporal. Recentemente foi mostrado um aumento na densidade dos axônios GABAérgicos no giro dentado em um modelo de epilepsia com pilocarpina, utilizando marcadores como a GAD e transportadores para o GABA do tipo 1 (GAT-1) (André et al., 2001). No entanto, experimentos no campo da eletrofisiologia sugerem uma redução na ação inibitória do GABA na região do CA1, durante e logo após a indução de convulsões epilépticas em ratos (Fisher and Alger, 1984; Franck et al., 2002).

Diante do que foi dito, fica evidente que existe uma pronunciada degeneração de neurônios GABAérgicos, provavelmente na pré e pós-sinapse, sendo assim, os receptores GABA_A poderão encontrar-se com funções alteradas nos casos de epilepsia. O GABA e a GAD são usados como marcadores pré-sinápticos e encontram-se reduzidos

nos casos de epilepsia. Em modelos animais de TLE (Litium/pilocarpina ou cainato), foi encontrado uma redução no *binding* para o receptor GABA_A a partir do uso de [³H]-muscimol ou ligantes da classe dos benzodiazepínicos com conseqüentes convulsões severas e danos no hipocampo (Kish et al., 1994; Kapur et al., 1994). Embora tenha sido observado um dano menos severo ou até mesmo ausência de neurodegeneração em modelos de animais com *kindling*, foi verificada uma redução no *binding* para o receptor GABA_A na região do CA1 do hipocampo (Titulaer et al., 1994; Titulaer et al., 1995). De forma semelhante, também foi encontrado uma redução *binding* para o receptor GABA_A na região do cerebelo (Bazyan et al., 2001).

A partir do estudo de lâminas moleculares do giro denteado contendo dendritos de células granulares, as quais são bastante ricas em diferentes subunidades para o receptor GABA_A (Sperk et al., 1997), foi verificada uma menor vulnerabilidade para a neurodegeneração nestas células (Sperk, 1994). Em modelos animais (ratos) de TLE, foi encontrada uma resistência para as células granulares desenvolverem neurodegeneração durante estado epiléptico, expressando uma alta concentração de receptores GABA_A. Estudos neuroquímicos e neurofisiológicos em modelos de epilepsia, sugerem que o funcionamento dos receptores GABAérgicos encontram-se alterados (Gibbs, 1997; Kapur and McDonald, 1997). A partir do uso de ligantes para o GABA_A (benzodiazepínicos), foi observado um aumento no *binding* para sítios envolvidos na convulsão induzida por eletrochoque (Nobrega et al., 1990; Tuff et al., 1983). Em alguns estudos, estas mudanças perduram por mais de 4 semanas (Titulaer et al., 1994; Titulaer et al., 1995).

A partir de estudos no campo da genética, foi mostrada uma forte evidência para alterações na função do receptor GABA_A, o que pode ser identificado como uma das

causas da epilepsia. Estes estudos mostraram que alterações na composição do receptor GABA_A, observadas a partir de uma deficiência na subunidade b (Homanics et al., 1997; Delore et al., 1998) e g2 (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001), foram relatadas na epilepsia. Estas alterações na expressão de subunidades do receptor GABA_A, tem sido intensamente estudadas em modelos animais e humanos com TLE. Em modelo animal de esclerose do corno de *Ammon*, foi encontrada uma redução de subunidades do receptor GABA_A em células piramidais (Schwarzer et al., 1997; Nishimura et al., 2003). Os resultados mais conclusivos com este modelo foram obtidos na região do giro dentado, na medida em que, as células granulares são mais resistentes ao dano causado pelas convulsões epiléticas em ratos. Em um modelo de convulsão induzida por cainato, foi encontrado um aumento no RNAm e na imunoreatividade para as subunidades $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 4$ e $\beta 1-3$ (menos evidente em g2) em células granulares (Schwarzer et al., 1997; Nishimura et al., 2003). Consistente com estes resultados, em um modelo de TLE (lítium/pilocarpina) foi verificado um aumento nos níveis de RNAm codificando as subunidades $\alpha 3, \alpha 4, \beta 3, \delta$ e ϵ em células granulares, embora tenha ocorrido uma redução nos níveis de RNAm para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ (Brooks-Kayal et al., 1998).

I.3. Objetivos e Organização do Trabalho desta Tese

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar se a administração do MMA no ventrículo induz convulsões de maneira dose-dependente;
2. Verificar se a administração intracerebroventricular (I.C.V.) de agonistas GABAérgicos GABA_A (muscimol) ou GABA_B (baclofen) alteram as convulsões induzidas por MMA;
3. Verificar se a administração I.C.V. de um antagonista do receptor N-Metil-D-Aspartado (MK-801) atenua as convulsões induzidas por MMA;
4. Investigar se a administração do MMA no ventrículo altera a atividade da glutamato descarboxilase (GAD) no córtex cerebral;
5. Avaliar se existe uma relação entre a duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA com alterações na atividade da GAD no córtex cerebral;
6. Verificar se a administração I.C.V. de agonistas GABAérgicos GABA_A (muscimol) ou GABA_B (baclofen) modificam a atividade da GAD no córtex cerebral após a injeção do MMA no ventrículo lateral;
7. Verificar se a administração I.C.V. de um antagonista do receptor N-Metil-D-Aspartado (MK-801) altera a atividade da GAD no córtex cerebral, após a injeção de MMA no ventrículo lateral;
8. Verificar se a administração I.C.V. de piridoxina (Vitamina B6) modifica as convulsões induzidas pelo MMA e a atividade da GAD no córtex cerebral;

CAPÍTULO II

Convulsions Induced by Methylmalonic Acid are Associated with Glutamic Acid Decarboxylase Inhibition in Rats: A Role for GABA in the Seizures Presented by Methylmalonic Acidemic Patients?

Carlos Ricardo Maneck Malfatti¹, Marcos Luiz Santos Perry², Ingrid Dalira Scheigert², Alexandre Pastoris Muller², Liana Pasquetti³, Flávia Karine Rigo³, Michele Rechia Fighera³, Emilio Rafael Garrido-Sanabria⁴, Carlos Fernando Mello^{3*}

Aceito para publicação na Neuroscience

Convulsions Induced by Methylmalonic Acid

are Associated with Glutamic Acid Decarboxylase Inhibition in Rats: A Role for GABA in the Seizures Presented by Methylmalonic Acidemic Patients?

Carlos Ricardo Maneck Malfatti¹, Marcos Luiz Santos Perry², Ingrid Dalira Scheigert², Alexandre Pastoris Muller², Liana Pasquetti³, Flávia Karine Rigo³,

Michele Rechia Figuera³, Emilio Rafael Garrido-Sanabria⁴, Carlos Fernando Mello^{3*}

¹Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, 96815-900, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

⁴Department of Biological Sciences, University of Texas at Brownsville
Brownsville, TX, 78520, USA

Running Title: MMA causes convulsions and GAD inhibition

*Corresponding author: Dr. Carlos Fernando Mello,

Departamento de Fisiologia e Farmacologia,

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil,

Telephone: +55 55 3220 9378 FAX: +55 55 3220 8241

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

ABSTRACT

Methylmalonic acid (MMA) is an endogenous convulsing compound that accumulates in methylmalonic acidemia, an inborn error of the metabolism characterized by severe neurological dysfunction, including seizures. The mechanisms by which MMA causes seizures involves the activation of the NMDA receptors, but whether GABAergic mechanisms are involved in the convulsions induced by MMA is not known. Therefore, in the current study we investigated the involvement of GABAergic mechanisms in the

convulsions induced by MMA. Adult rats were injected (i.c.v.) with muscimol (46 pmol/1 ml), baclofen (0.03, 0.1 and 0.3 $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$), MK-801 (6 nmol/1 μl), pyridoxine (2 $\mu\text{mol}/4 \mu\text{l}$) or physiological saline (0.15 $\mu\text{mol}/1 \text{ml}$). After thirty minutes, MMA (0.3, 0.1 and 3 $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$) or NaCl (6 $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$, i.c.v.) was injected. The animals were immediately transferred to an open field and observed for the appearance of convulsions. After behavioral evaluation, glutamate decarboxylase (GAD) activity was determined in cerebral cortex homogenates by measuring the $^{14}\text{CO}_2$ released from $\text{L}-[^{14}\text{C}]$ -glutamic acid. Convulsions were confirmed by electroencephalographic recording in a subset of animals. MMA caused the appearance of clonic convulsions in a dose-dependent manner and decreased GAD activity in the cerebral cortex *ex vivo*. GAD activity negatively correlated with duration of MMA-induced convulsions ($r=-0.873$, $P<0.01$), in an individual basis. Muscimol, baclofen, MK-801 and pyridoxine prevented MMA-induced convulsions, but only MK-801 and pyridoxine prevented MMA-induced GAD inhibition. These data suggest GABAergic mechanisms are involved in the convulsive action of MMA, and that GAD inhibition by MMA depends on the activation of NMDA receptors or enzyme protection by pyridoxine. While in this study we present novel data about the role of the GABAergic system in MMA-induced convulsions, the central role of NMDA receptors in the neurochemical actions of MMA is further reinforced since they seem to trigger GABAergic failure.

Key Words: NMDA receptors, GAD, methylmalonic acidemia, convulsion

INTRODUCTION

Methylmalonic acid (MMA) is the main metabolite that accumulates in methylmalonic acidemia, an inborn metabolic error characterized by severe neurological dysfunction, including convulsions (Fenton and Rosenberg, 1995). MMA has been reported to inhibit brain creatine kinase (Schuck et al., 2004), b-hydroxybutyrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase (Dutra et al., 1993), and respiratory chain complexes activities (Brusque et al., 2002), leading to decreased CO₂ production (Wajner et al., 1992) and O₂ consumption (Toyoshima et al., 1995). In addition, MMA increases lactate production (Wajner et al., 1992) and decreases ATP/ADP ratio (McLaughlin et al., 1998). MMA-induced mitochondrial failure is associated with opening of the mitochondrial permeability transition pore (Maciel et al., 2004) and generation of reactive species, which result in increased cellular oxidative damage and decreased activity of Na⁺,K⁺-ATPase (Wyse et al., 2000, Malfatti et al., 2003), an enzyme that plays a critical role in maintaining membrane excitability. Secondary activation of NMDA receptors ensues as an immediate consequence of these events, causing neuronal depolarization (McLaughlin et al., 1998), LTP induction (Calabresi et al., 2001), convulsions and irreversible neuronal damage in animals intrastrially injected with MMA (Narasimhan et al., 1996).

A role for glutamate (de Mello et al., 1996, Brusque et al., 2001) and, to a lesser extent, for dopamine (Calabresi et al., 2001) has been proposed in the electrophysiological and behavioral effects of MMA. However, little is known about the effects of MMA on other neurotransmitter systems that are important in the development of seizures, such as the GABAergic system.

As the main inhibitory neurotransmitter in the vertebrate CNS, g-amino butyric acid (GABA) modulates every aspect of brain function. The action of GABA is mediated by ionotropic (GABA_A) and metabotropic (GABA_B) receptors, which are possibly ubiquitously expressed on every single neuron in the CNS. GABAergic function is fine-tuned at multiple levels, including transmitter synthesis by two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) (Erlander et al., 1991, Esclapez et al., 1994, Soghomonian and Martin, 1998); vesicular storage (Dumoulin et al., 1999); Ca²⁺-dependent and independent release (Wall and Usowicz, 1997, Vautrin et al., 2000); uptake by neurons and glial cells (Borden, 1996); and activation of multiple receptors, localized pre-, post-, and extrasynaptically (Belelli et al., 2005). All these components are not only molecularly heterogeneous, but are regulated both at the transcriptional and post-transcriptional level, thus allowing an extremely complex array of interactions at the molecular, cellular, and systemic level. The significance of GABAergic transmission is underscored by multiple neurological and psychiatric diseases for which an alteration in the GABAergic system has been postulated, including epilepsy (Olsen et al., 1999, Coulter, 2001, Avoli et al., 2005) and anxiety disorders (Wong et al., 2003), among others.

Regulation of GABA-mediated signaling involves several mechanisms, among which modulation of GABA synthesis or degradation by rate-limiting enzymes glutamate decarboxylase (GAD) and g-amino butyric acid transaminase (GABA-T), respectively, play a central role. In fact, reduced GABA concentrations in the brain lead to convulsions and neuronal damage (Gale, 1992).

GAD is considered unique among enzymes involved in neurotransmitter synthesis because both its substrate and product are neurotransmitters, and exhibit opposite actions, since L-glutamate and GABA act as excitatory and inhibitory neurotransmitters,

respectively. The role of inhibitory (GABA) and excitatory (glutamate) neurotransmission in the genesis of convulsions and epilepsy has been reviewed by several authors, and a large body of evidence supports the view that convulsions may arise from either an impairment of GABAergic, or excessive glutamatergic function (Scheyer, 1998, Treiman, 2001, Mody, 2004). In line with this view, inhibition of GAD depletes GABA in the brain and induces seizures (Wood and Peesker, 1973, Arias et al., 1992, Salazar et al., 1994), while GABA-T inhibition enhances GABA levels and has anticonvulsant activity (Loscher and Horstmann, 1994). In fact, several models of focal epilepsy are based on the impairment of cortical GABAergic activity (Morris et al., 1980, Yang and Benardo, 1997, Lima et al., 1998), and GAD autoantibodies have been reported in patients with drug refractory epilepsy (Giometto et al., 1998, Vianello et al., 2002). Accordingly, although no consistent correlation between ictal foci and reduced levels of GABA in intractable non-neoplastic focal epilepsy of humans were found, the activity of GAD is significantly decreased in epileptic cortex of patients (Lloyd et al., 1986). Moreover, both GAD isoforms are up-regulated in remaining GABAergic neurons in a model of temporal epilepsy (Esclapez and Houser, 1999).

There are lines of evidence suggesting an interaction between reactive species and the GABAergic system. While some authors argue that reactive species may impair GABAergic function (Davis et al., 2001, Schloss, 2002) and lead to increased excitability and convulsions, others suggest that reactive species generation may be one of the mechanisms by which GABAergic antagonists cause convulsions (Oliveira et al., 2004). Supporting such an interaction are the studies that have demonstrated that GAD is particularly sensitive to reactive species, and that GAD inhibition increases FeCl₃-induced epileptogenesis (Robitaille et al., 1995).

Therefore, considering that GAD is particularly sensitive to reactive species, and that MMA causes convulsions and reactive species generation, in the current study we investigate whether GAD activity is affected in MMA-induced seizures, and whether maintaining the GABAergic tonus with specific agonists prevent the seizures and GAD inhibition induced by MMA. In addition, we investigate whether NMDA receptors are involved in the inhibition of GAD by MMA.

MATERIAL AND METHODS

Animals and reagents: Adult male Wistar rats (270-300 g) maintained on a 12:12 h light/dark cycle, with free access to tap water and standard lab chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) were used, and each animal was used only once. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Behavioral evaluation and EEG recording: Animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula (28 gauge) was inserted unilaterally into the right lateral ventricle at the coordinates relative to bregma (in mm): AP, 0; L, 1.5; V, 3.0 from the dura (Paxinos and Watson, 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. In a subset of animals, two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100 μ m) were implanted unilaterally into the right hippocampus at the coordinates (in mm) AP, 4; L, 3.0; V, 2.0 (Paxinos and Watson, 1986). The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement.

Five to seven days after the surgical procedure, the animals were injected (i.c.v.)

with muscimol (46 pmol/1 ml), baclofen (0.3 μ mol/1 μ l), MK-801 (6 nmol/1 μ l), pyridoxine (2 μ mol/4 μ l) or physiological saline (0.15 μ mol/1 μ l). The dose of muscimol (46 pmol) was selected on the basis that it prevented alpha-ketoisovaleric acid-induced convulsions in a previous study (Coitinho et al., 2001). Similarly, the dose of MK-801 used in this study (6 nmol) effectively prevented the convulsions induced by MMA in a previous study (de Mello et al., 1996). After thirty minutes, buffered MMA (3 μ mol/1 μ l) or NaCl (6 μ mol/1 μ l) was injected into the ventricle. MMA solutions were neutralized with NaOH to pH 7.4 and injections were performed over a 2 min interval. Immediately after the injections the animals were transferred to a round open field (54.7 cm diameter). The open field session lasted 15 min, and during this time the animals were observed for the appearance of clonic or tonic convulsions. The number of convulsive episodes and total time spent in convulsive behaviour were recorded. If the animal spent at least 10 seconds without behavioral manifestations, and clonic movements restarted, a new convulsive episode was counted. Five minutes after the open field session the animals were sacrificed by decapitation and GAD activity was measured in cerebral cortex homogenates, as described below. In the subset of animals in which EEG was performed (n=3 in each group), EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass) and recorded using an analogical electroencephalographer (Berger TP119). Several 30-s epochs were selected from preinfusion (10 min) and postinfusion periods to determine significant EEG changes. Epileptic discharges (interictal spikes) were defined as abnormal paroxystic EEG activity in the hippocampal and cortical recordings, and consisted of high-amplitude biphasic sharp transients (amplitude: > 200 μ V). Hippocampal epileptic discharges (interictal spikes) were defined as abnormal EEG activity in the hippocampal recordings and consisted of high-amplitude biphasic sharp transients (amplitude: \geq 2.5 mV) and a duration >50 ms. Epileptic

discharges were distinct from sharp waves present in the normal hippocampus EEG (<2 mV) (Bragin et al., 1999). The preinfusion segment was defined as ending immediately before the beginning of infusion. The postinfusion epochs started immediately after the end of muscimol (46 pmol/1 ml), baclofen (0.3 μ mol/1 μ l), MK-801 (6 nmol/1 μ l), pyridoxine (2 μ mol/4 μ l) or physiological saline (0.15 μ mol/1 μ l) and MMA (3 μ mol/1 μ l) or NaCl (6 μ mol/1 μ l) infusion.

Glutamate decarboxylase activity. Twenty minutes after MMA injection into the ventricle, a subset of the animals were sacrificed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. The cortex was rapidly dissected on an inverted Petri dish placed on ice. Tissues were homogenized in 50 mM potassium phosphate, pH 6.4 (1:10, w/v), with a glass homogeniser. The GAD activity was determined by subtracting the penicillamine-sensitive activity from the overall decarboxylase activity (in the absence of penicillamine), according to Albers and Brady (Albers and Brady, 1959). Aliquots of 500 μ l of tissue homogenate (1:10, w/v) were incubated in glass tubes for 60 min at 37 °C in presence of (concentrations in mM) potassium phosphate buffer (pH: 6.4) 50, 2-mercaptoethanol 10, pyridoxal-P 1, DL-[¹⁴C]-glutamic acid (specific activity 58 mCi/mmol) 15 (saturating concentration), in the presence or absence of 10 mM D-penicillamine.

Incubations were carried out in flasks after contents were gassed with 100% O₂ for 1 min and then sealed with rubber caps. The homogenate were incubated at 37 °C during 60 min in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min) according to the method of Dunlop et al. (Dunlop et al., 1975). Incubation was stopped by adding 0.25 ml 50% TCA through the rubber cap. Then 0.1 ml of 1 M hyamine hydroxide was injected into the central wells. The flasks were shaken for a further 30 min at 37 °C to trap CO₂. After, the content of the central wells were transferred to vials, and assayed for CO₂ radioactivity in a liquid-

scintillation counter.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out by one or two-way analysis of variance (ANOVA) and *F*-values are presented only if $P < 0.05$. Post-hoc analysis was carried out, when appropriate, by the Student-Newman-Keuls test.

RESULTS

Figures 1A and 1B show that MMA (1 and 3 μmol) injection into the ventricle caused the appearance of convulsions, characterized as episodes of myoclonic jerks (clonic movements) involving forelimbs and hindlimbs [$F(3,16) = 3.58$, $P < 0.05$ and $F(3,16) = 18.63$, $P < 0.05$ for number of convulsive episodes and time spent convulsing, respectively].

Analysis of EEG recordings revealed that MMA triggered a series of EEG phenomena in a stereotyped way (Fig. 2A-D). Figure 2A shows the basal EEG recording and 2B after the injection of physiological saline (0.15 mol/1 ml). An abrupt sequence of high amplitude (approx $> 300 \mu\text{V}$) spikes (ictal event) appeared 3-5 min after injection of MMA (3 mmol/ 1 ml) emerging from a pre-drug baseline electrical activity (Figure 2C). The short-duration ictal event (< 10 s) was characterized by a relatively low-frequency spiking activity (3-5 Hz) and a progressive decrease in voltage after 5-6 sec onset. At the end of the ictal episode spiking activity there was an attenuation of the spike amplitudes and apparent increase in frequency, more evident at the ipsilateral electrodes (Fig. 2C). These bursts of activity repeated in the following ~ 10 -15 min, and vanished after ~ 20 min, when only an increase in the amplitude in the cerebral cortex, without evident behavioral alterations, was observed (Fig 2D). The latencies measured between epileptic discharges recorded in the hippocampus and the ipsi- and contralateral cortical recordings were analyzed independently for the first spikes. However, it was not possible to determine if ictal events had a hippocampal or cortical onset.

Twenty minutes after MMA injection into the ventricle, GAD activity was measured in the cerebral cortex. Statistical analysis showed that injection of MMA (3 μ mol) caused a ~40% decrease in GAD activity in this cerebral structure compared to the respective NaCl control [Control: 2.15 ± 0.1 ; MMA: 1.3 ± 0.1 pmol CO₂/mg of tissue/h (means \pm S.E.M.); $F(1,14)=4.9$; $P<0.005$]. In addition, duration of MMA-induced convulsive episodes correlated negatively with GAD activity ($r=-0.873$, $P<0.01$; Fig. 3).

The involvement of GABAergic mechanisms in the convulsant effect of MMA was investigated by injecting the animals with a GABA_A or a GABA_B agonist (muscimol and baclofen, respectively). The injection of muscimol prevented MMA-induced convulsions [significant pre-treatment (muscimol or physiological saline) X treatment (NaCl or MMA) interaction for number: $F(1,16)=6.91$, $P<0.05$; Fig. 4A, and duration of convulsive episodes: $F(1,16)=33.62$, $P<0.05$; Fig. 4B]. Accordingly, muscimol injection slightly decreased amplitude and fully prevented MMA-induced EEG alterations (Fig. 5A-D). Baclofen also decreased MMA-induced convulsions in a dose-dependent manner [significant pre-treatment (baclofen or physiological saline) X (NaCl or MMA) interaction for number: $F(1,39)=4.46$, $P<0.05$; Fig. 6A, and duration of convulsive episodes: $F(1,39)=11.87$, $P<0.05$; Fig. 6B]. The inhibition of MMA-induced convulsions by baclofen (0.3 μ mol) was confirmed by EEG, which is shown in Fig. 7A-D. It is worth remarking that neither baclofen (0.3 μ mol) nor muscimol (46 pmol) altered motor activity of the animals, or caused other behavioural alterations, such as rotations. The non-competitive NMDA antagonist, MK-801, prevented MMA-induced convulsions [significant pre-treatment (MK-801 or physiological saline) X treatment (NaCl or MMA) interaction for number: $F(1,22)=13.9$, $P<0.05$; Fig. 8A, and duration of convulsive episodes: $F(1,22)=18.1$ $P<0.05$; Fig. 8B]. In addition, MK-801 slightly decreased amplitude and fully prevented MMA-induced

EEG alterations (Fig. 9A-D).

The injection of pyridoxine prevented MMA-induced convulsions [significant pretreatment (pyridoxine or physiological saline) X treatment (NaCl or MMA) interaction for number: $F(1,30)= 5.1$, $P<0.05$; Fig. 10A, and duration of convulsive episodes: $F(1,30)= 12.36$, $P<0.05$; Fig.10B]. Accordingly, pyridoxine injection fully prevented MMA-induced EEG alterations in the three animals tested (Fig. 11A-D).

Interestingly, muscimol and baclofen failed to prevent MMA-induced decrease of GAD activity and only MK-801 [significant pretreatment (MK-801 or physiological saline) by treatment (MMA or NaCl) interaction $F(1,24)=8.13$; $P<0.01$; Fig. 12 A-D] and pyridoxine [significant pretreatment (pyridoxine or physiological saline) by treatment (MMA or NaCl) interaction: $F(1,30)= 4.95$, $p<0.05$; Fig. 12 A-D] prevented MMA-induced decrease of GAD activity. These data suggest that GAD inhibition in the cerebral cortex follows NMDA receptor activation in the cascade of events induced by the intracerebroventricular injection of MMA. In addition, it is particularly remarkable that the injection of the glutamatergic antagonist (MK-801), pyridoxine and GABAergic agonists (muscimol or baclofen) did not alter GAD activity in nonconvulsing animals (Figure 12 A-D: muscimol+NaCl, baclofen+NaCl; MK-801+NaCl; pyridoxine+NaCl groups).

DISCUSSION

In the current study we showed that the intracerebroventricular injection of MMA causes seizures and that pyridoxine (a precursor of pyridoxal phosphate, the cofactor for GAD), baclofen (a GABA_B agonist), and muscimol (a GABA_A agonist) decrease MMA-induced convulsions. In addition, we showed that the duration of MMA-induced convulsions correlates with a decrease in total GAD activity. MMA-induced GAD inhibition

was prevented by pyridoxine and by the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801, but not by baclofen or muscimol. The injection of GABAergic agonists, pyridoxine or MK-801 did not alter GAD activity in animals injected with NaCl, instead of MMA (control animals, which did not present convulsions).

The role of excitatory (glutamatergic) and inhibitory (GABAergic) neurotransmission has been considered essential in the development of seizures. In this respect, both compromised GABAergic function (Mody, 2004) or excessive glutamatergic function may lead to convulsions (Meldrum, 1995a, Meldrum, 1995b).

In previous studies we have shown that glutamatergic receptors of the NMDA subtype are involved in the convulsions and oxidative damage induced by MMA (de Mello et al., 1996, Royes et al., 2006). However, The novel and most important finding of this study is the demonstration, for the first time, that GABAergic mechanisms play a role in MMA-induced convulsions.

Four lines of evidence supporting a role for GABAergic mechanisms in MMA-induced seizures are presented in this study. First, increasing GABAergic tonus by injecting low doses of GABA_A and GABA_B agonists significantly attenuated MMA-induced seizures, measured by behavioral (Figures 4 and 6, respectively) and electrographic methods (Figures 5 and 7, respectively). Accordingly, the prevention of MMA-induced convulsions by the pharmacological reestablishment of the GABAergic tonus with GABAergic agonists suggests that a decrease in GABAergic tonus underlies the convulsant action of MMA. These results are in full agreement with the view that a general decrease in GABAergic function (Gale, 1992, Wong et al., 2003) causes seizures. Second, the injection of MMA decreased GAD activity *ex vivo*, which negatively correlated with the duration of MMA-induced convulsions. This finding is particularly remarkable, since the more was GAD

inhibited, the more animals presented seizures, as evidenced by the highly significant negative correlation ($r=-0.873$, $P<0.01$) between these events (Figure 3), which suggests that GAD inhibition mediates the convulsant action of MMA. Third, pyridoxine prevented seizures and GAD inhibition induced by MMA injection. Pyridoxine is known to be taken up rapidly by most mammalian cells and converted to pyridoxal phosphate, an essential cofactor for GAD (Rogers et al., 1994). In fact, pyridoxal phosphate activates GAD by associating with the apoenzyme and by facilitating the conversion of the complex to the active holoenzyme (Porter and Martin, 1986), which is more resistant to heat inactivation (Porter and Martin, 1988) and less susceptible to inhibition by other agents, such as aspartate, ATP and GABA (Porter and Martin, 1984, Porter and Martin, 1987). We took advantage of the protective properties of pyridoxamine against GAD inhibition in order to obtain further evidence of the involvement of GAD in MMA-induced seizures, since if pyridoxamine protected against GAD inhibition induced by MMA, it should also decrease MMA-induced seizures. As described above, the predicted protective effects of pyridoxine against GAD inhibition and seizures induced by MMA were confirmed in our assays, further supporting a role for GAD in MMA-induced seizures.

Fourth, GAD inhibition and convulsions induced by MMA were prevented by the noncompetitive NMDA receptor antagonist, MK-801. These results further indicates that protecting GAD activity against the inhibitory effect of MMA (with MK-801) reestablishes GABAergic tonus, and consequently decreases the convulsions caused by the organic acid.

These findings are in full agreement with previous studies that have shown that inherited GAD deficiency (Jardim et al., 1994, Kash et al., 1997) or its inhibition by specific or unspecific inhibitors leads to seizures (Abe and Matsuda, 1979, Arias et al., 1992, Davis et al., 2001, Netopilova et al., 2001).

In addition, the results from the experiments with MK-801 also provide a possible cause for the decrease in GAD activity induced by MMA. MK-801 prevented not only MMA-induced convulsions, but also the decrease in GAD activity induced by this dicarboxylic acid, supporting a role for NMDA receptors in both events. Therefore, we may suggest that the activation of NMDA receptors plays a central role in MMA-induced seizures: they increase excitatory tonus by activating cation currents, and decrease inhibitory tonus by disrupting GABAergic transmission.

The mechanisms by which NMDA receptor stimulation decreases GAD activity are unknown. However, it is known that activation of NMDA receptors is coupled to Ca^{2+} influx, NO production and generation of reactive species (Alano et al., 2002, Moncada and Bolanos, 2006). Therefore, one might suppose that MMA could regulate GAD activity by one of these mechanisms, such as NMDA receptor-mediated Ca^{2+} increase. In fact, recent evidence suggests that GAD65 is a substrate for protein kinase C (PKC), but its phosphorylation causes enzyme activation, instead of inhibition (Wei et al., 2004). In addition, GAD65 is phosphorylated by a Ca^{2+} -independent PKC, making a regulation of GAD65 activity by a Ca^{2+} -dependent mechanism sounds unlike (Wei et al., 2004). GAD67 is also inhibited by phosphorylation, but mediated by a protein kinase A, which is also independent of Ca^{2+} (Wei et al., 2004). Therefore, our data do not fit with the literature in what concerns a possible role for Ca^{2+} -dependent phosphorylation/dephosphorylation in the regulation of GAD activity.

While the physiological opening of NMDA receptors causes the activation of Ca^{2+} -dependent kinases and phosphatases, its sustained activation also triggers mitochondrial uncoupling and generation of reactive species (Said et al., 2000, Alano et al., 2002, Sullivan et al., 2005). In fact, we have demonstrated that MMA induces lipoperoxidation

and protein carbonylation through NMDA-mediated mechanisms (Royes et al., 2003, Royes et al., 2006). Therefore, it is possible that MMA-induced oxidative modifications cause GAD inhibition. In this respect, it is remarkable that GAD65 and GAD67 are extremely sensitive to the sulfhydryl reagent N-ethyl-maleimide, since both enzymes have cysteine groups that are critical for enzyme activity and a potential target for reactive species (Wei and Wu, 2005). In line with this view, it has been reported that increased oxygen pressure induces convulsions and decreases cortical GAD activity and GABA levels (Morris et al., 1980), and that GAD is inhibited by nitric oxide, as well (Davis et al., 2001). Interestingly, MMA injection increases nitric oxide production (Furian et al., 2006), and it is possible that nitric oxide mediates MMA-induced inhibition of GAD.

In summary, while in this study we present exciting novel data about the role of the GABAergic system in MMA-induced convulsions, the central role of NMDA receptors in the neurochemical actions MMA is further reinforced as they seem to trigger GABAergic failure. Our findings may also have important clinical implications as it may help the planning of adjuvant anticonvulsant therapy for methylmalonic patients, which may advantageously include a GABAergic agent.

References:

- Abe, M. and Matsuda, M., 1979. Effect of antivitamin B6 on regional GABA metabolism in mouse brain and its relation to convulsions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 25, 459-468.
- Alano, C. C., Beutner, G., Dirksen, R. T., Gross, R. A. and Sheu, S. S., 2002. Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J Neurochem*. 80, 531-538.
- Abers, R. W. and Brady, R. O., 1959. The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey. *J Biol Chem*. 234, 926-928.
- Arias, C., Valero, H. and Tapia, R., 1992. Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups. *J Neurochem*. 58, 369-373.
- Avoli, M., Louvel, J., Pumain, R. and Kohling, R., 2005. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol*. 77, 166-200.
- Belelli, D., Peden, D. R., Rosahl, T. W., Wafford, K. A. and Lambert, J. J., 2005. Extrasynaptic GABA_A receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics. *J Neurosci*. 25, 11513-11520.
- Borden, L. A., 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int*. 29, 335-356.
- Bragin, A., Engel, J., Jr., Wilson, C. L., Fried, I. and Mathern, G. W., 1999. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures. *Epilepsia*. 40, 127-137.
- Brusque, A. M., Rosa, R. B., Schuck, P. F., Dalcin, K. B., Ribeiro, C. A. J., Silva, C. G., Wannmacher, C. M. D., Dutra, C. S., Wyse, A. T. S., Briones, P. and Wajner, M., 2002. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex

by methylmalonic acid. *Neurochem Int.* 40, 593-601.

Brusque, A. M., Rotta, L. N., Tavares, R. G., Emanuelli, T., Schwarzbald, C. V., Dutra, C. S., Wyse, A. T. D., Wannmacher, C. M. D., de Souza, D. O. G. and Wajner, M., 2001. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 920, 194-201.

Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Greengard, P., Hipskind, R. A., Borrelli, E. and Bernardi, G., 2001. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci.* 21, 5110-5120.

Coitinho, A. S., de Mello, C. F., Lima, T. T., de Bastiani, J., Figuera, M. R. and Wajner, M., 2001. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res.* 894, 68-73.

Coulter, D. A., 2001. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol.* 45, 237-252.

Davis, K., Foos, T., Wu, J. Y. and Schloss, J. V., 2001. Oxygen-induced seizures and inhibition of human glutamate decarboxylase and porcine cysteine sulfinic acid decarboxylase by oxygen and nitric oxide. *J Biomed Sci.* 8, 359-364.

de Mello, C. F., Begnini, J., Jimenez-Bernal, R. E., Rubin, M. A., de Bastiani, J., da Costa, E., Jr. and Wajner, M., 1996. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721, 120-125.

Dumoulin, A., Rostaing, P., Bedet, C., Levi, S., Isambert, M. F., Henry, J. P., Triller, A. and Gasnier, B., 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in

GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci.* 112, 811-823.

Dunlop, D. S., Vanelden, W. and Lajtha, A., 1975. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of rat brain. *Brain Res.* 99, 303-318.

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

Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N. and Tobin, A. J., 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* 7, 91-100.

Esclapez, M. and Houser, C. R., 1999. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol.* 412, 488-505.

Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Tobin, A. J. and Houser, C. R., 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci.* 14, 1834-1855.

Fenton, W. A. and Rosenberg, L. E., 1995. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: C.G., S. et al. (Eds.), *The Metabolic Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill, New York, pp. 1423-1449.

Furian, A. F., Figuera, M. R., Ferreira, A. P. O., Oliveira, M. S., Fiorenza, N. G., C., M. J., Petry, J. C., Coelho, R. C., Mello, C. F. and Royes, L. F., 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in the striatum. *Neurochem Int.* 50, 164-171.

- Gale, K., 1992. Role of GABA in the genesis of chemoconvulsant seizures. *Toxicol Lett.* 64-65 Spec No, 417-428.
- Giometto, B., Nicolao, P., Macucci, M., Tavalato, B., Foxon, R. and Bottazzo, G. F., 1998. Temporal-lobe epilepsy associated with glutamic-acid-decarboxylase autoantibodies. *Lancet* 352, 457.
- Jardim, L. B., Pires, R. F., Martins, C. E. S., Vargas, C. R., Vizioli, J., Kliemann, F. A. D. and Giugliani, R., 1994. Pyridoxine-dependent seizures associated with white matter abnormalities. *Neuropediatrics* 25, 259-261.
- Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D. and Baekkeskov, S., 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14060-14065.
- Lima, T. T., Begnini, J., de Bastiani, J., Fialho, D. B., Jurach, A., Ribeiro, M. C., Wajner, M. and de Mello, C. F., 1998. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res.* 802, 55-60.
- Lloyd, K. G., Bossi, L., Morselli, P. L., Munari, C., Rougier, A. and Loiseau, H., 1986. Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. In: Delgado-Escueta, A. V. et al. (Eds.), *Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Raven Press, New York, pp. 1033-1044.
- Loscher, W. and Horstermann, D., 1994. Differential effects of vigabatrin, gamma-acetylenic GABA, aminooxyacetic acid, and valproate on levels of various amino acids in rat brain regions and plasma. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 349, 270-278.
- Maciel, E. N., Kowaltowski, A. J., Schwalm, F. D., Rodrigues, J. M., Souza, D. O., Vercesi,

- A. E., Wajner, M. and Castilho, R. F., 2004. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem.* 90, 1025-1035.
- Malfatti, C. R. M., Royes, L. F. F., Francescato, L., Sanabria, E. R. G., Rubin, M. A., Cavalheiro, E. A. and Mello, C. F., 2003. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na^+, K^+ -ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44, 761-767.
- McLaughlin, B. A., Nelson, D., Silver, I. A., Erecinska, M. and Chesselet, M. F., 1998. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 86, 279-290.
- Meldrum, B., 1995a. Epilepsy. Taking up GABA again. *Nature* 376, 122-123.
- Meldrum, B. S., 1995b. Excitatory amino acid receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 757, 492-505.
- Mody, I., 2004. Another "tonic" in the realm of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 4, 248-249.
- Moncada, S. and Bolanos, J. P., 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.* 97, 1676-1689.
- Morris, D. F., Haya, K., Zempel, J. A. and Schowen, R. L., 1980. GABA metabolism in O_2^- induced convulsions. *Brain Res Bulletin.* 5, 789-792.
- Narasimhan, P., Sklar, R., Murrell, M., Swanson, R. A. and Sharp, F. R., 1996. Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid. *J Neurosci.* 16, 7336-7346.
- Netopilova, M., Haugvicova, R., Kubova, H., Drsata, J. and Mares, P., 2001. Influence of convulsants on rat brain activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. *Neurochem Res.* 26, 1285-1291.

- Oliveira, M. S., Furian, A. F., Royes, L. F. F., Figuera, M. R., Myskiw, J. D., Fiorenza, N. G. and Mello, C. F., 2004. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721-728.
- Olsen, R. W., DeLorey, T. M., Gordey, M. and Kang, M. H., 1999. GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol.* 79, 499-510.
- Paxinos, G. and Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, San Diego.
- Porter, T. G., Martin, D. L., 1984. Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem.* 43, 1464-1467.
- Porter, T. G., Martin, D. L., 1986. Non-steady-state kinetics of brain glutamate decarboxylase resulting from interconversion of the apo- and holoenzyme. *Biochim Biophys Acta* 874, 235-244.
- Porter, T. G., Martin, D. L., 1987. Rapid inactivation of brain glutamate decarboxylase by aspartate. *J Neurochem.* 48, 67-72.
- Porter, T. G., Martin, D. L., 1988. Stability and activation of glutamate apodecarboxylase from pig brain. *J Neurochem.* 51, 1886-1891.
- Robitaille, Y., Kemball, K. and Sherwin, A. L., 1995. beta-alanine uptake is upregulated in FeCl₃-induced cortical scars. *J Neurol Sci.* 134 Suppl, 95-101.
- Rogers KS, Mohan C., 1994. Vitamin B6 metabolism and diabetes. *Biochem Med Metab Biol.* 52, 10-7.
- Royes, L. F., Figuera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., da Silva, L. G., Malfatti, C. R., Schneider, P. H., Braga, A. L., Wajner, M. and Mello, C. F., 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal

injection of methylmalonate. *Neuroscience*. 118, 1079-1090.

Royes, L. F. F., Figuera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Myskiw, J. D., Fiorenza, N. G., Petry, J. C., Coelho, R. C. and Mello, C. F., 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav*. 83, 136-144.

Said, S. I., Pakbaz, H., Berisha, H. I. and Raza, S., 2000. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 28, 1300-1302.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. and Tapia, R., 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-aminobutyric acid. *Neurochem Int*. 24, 363-368.

Scheyer, R. D., 1998. Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog Brain Res*. 116, 359-369.

Schloss, J. V., 2002. Oxygen toxicity from plants to people. *Planta*. 216, 38-43.

Schuck, P. F., Rosa, R. B., Pettenuzzo, L. F., Sitta, A., Wannmacher, C. M. D., Wyse, A. T. S. and Wajner, M., 2004. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int*. 45, 661-667.

Soghomonian, J. J. and Martin, D. L., 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*. 19, 500-505.

Sullivan, P. G., Rabchevsky, A. G., Waldmeier, P. C. and Springer, J. E., 2005. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 79, 231-239.

Toyoshima, S., Watanabe, F., Saido, H., Miyatake, K. and Nakano, Y., 1995. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr*. 125, 2846-2850.

- Treiman, D. M., 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*. 42 Suppl 3, 8-12.
- Vautrin, J., Maric, D., Sukhareva, M., Schaffner, A. E. and Barker, J. L., 2000. Surface-accessible GABA supports tonic and quantal synaptic transmission. *Synapse*. 37, 38-55.
- Vianello, M., Tavalato, B. and Giometto, B., 2002. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies and neurological disorders. *Neurol Sci*. 23, 145-151.
- Wajner, M., Dutra, J. C., Cardoso, S. E., Wannmacher, C. M. D. and Motta, E. R., 1992. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inherit Metab Dis*. 15, 92-96.
- Wall, M. J. and Usowicz, M. M., 1997. Development of action potential-dependent and independent spontaneous GABA_A receptor-mediated currents in granule cells of postnatal rat cerebellum. *Eur J Neurosci*. 9, 533-548.
- Wei, J., Davis, K. M., Wu, H. and Wu, J. Y., 2004. Protein phosphorylation of human brain glutamic acid decarboxylase (GAD)65 and GAD67 and its physiological implications. *Biochemistry* 43, 6182-6189.
- Wei, J. and Wu, J. Y., 2005. Structural and functional analysis of cysteine residues in human glutamate decarboxylase 65 (GAD65) and GAD67. *J Neurochem*. 93, 624-633.
- Wong, C. G., Bottiglieri, T. and Snead, O. C., 3rd, 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*. 54 Suppl 6, S3-12.
- Wood, J. D. and Peesker, S. J., 1973. The role of GABA metabolism in the convulsant and anticonvulsant actions of aminooxyacetic acid. *J Neurochem*. 20, 379-387.
- Wyse, A. T. S., Streck, E. L., Barros, S. V. T., 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.

Yang, L. and Benardo, L. S., 1997. Epileptogenesis following neocortical trauma from two sources of disinhibition. *J Neurophysiol.* 78, 2804-2810.

Legends

Figure 1. MMA (1-3 mmol) causes clonic convulsions, measured as (A) number of convulsive episodes and (B) time spent convulsing. N= 7 in each group. * $P < 0.05$ compared to physiological saline (SNK Test).

Figure 2. Basal electroencephalographic recordings (preinfusion; A); after the injection of physiological saline (B); and seizure sequence observed 3-5 min after intracerebroventricular injection of 3 μmol MMA (postinfusion; C). An arrow indicates the beginning of a convulsive episode (C), which was accompanied by the behavioral alterations described in the Results section. EEG recording after 20 min, when no apparent behavioral alterations were observed (D).

Figure 3. GAD activity negatively correlates with duration of MMA-induced convulsive episodes. $P < 0.01$ by the Pearson's correlation coefficient ($r = -0.873$).

Figure 4. Muscimol decreases MMA-induced convulsions, measured as (A) number of convulsive episodes and (B) time spent convulsing. Data are mean + S.E.M., N= 8 in each group. * $P < 0.05$ compared to control physiological saline (SNK Test).

Figure 5. Basal electroencephalographic recordings (preinfusion; A); after the injection of 46 pmol of muscimol (B); 5 min (C) and 20 min (D) after the intracerebroventricular injection of MMA (3 μmol).

Figure 6. Baclofen decreases MMA-induced convulsions, measured as (A) number of convulsive episodes and (B) time spent convulsing. Data are mean \pm S.E.M., N= 8 in each group. * $P < 0.05$ compared to control (SNK Test).

Figure 7. Basal electroencephalographic recordings (preinfusion; A); after the injection of 0.3 mmol of baclofen (B); 5 min (C) and 20 min (D) after the intraventricular injection of

MMA (3 μ mol).

Figure 8. MK-801 decreases MMA-induced convulsions measured as (A) number of convulsive episodes and (B) time spent convulsing. Data are mean \pm S.E.M., N= 13 in each group. * P <0.05 compared to control physiological saline (SNK Test).

Figure 9. Basal electroencephalographic recordings (preinfusion; A); after the injection of 6 nmol of MK-801 (B); 5 min (C) and 20 min (D) after the intraventricular injection of MMA (3 μ mol).

Figure 10. Pyridoxine decreases MMA-induced convulsions measured as (A) number of convulsive episodes and (B) time spent convulsing. Data are mean \pm S.E.M., N= 8-9 in each group. * P <0.05 compared to control physiological saline (SNK Test).

Figure 11. Basal electroencephalographic recordings (preinfusion; A); after the injection of 2 mmol of pyridoxine (B); 5 min (C) and 20 min (D) after the intraventricular injection of MMA (3 μ mol).

Figure 12. MK-801 (A) and pyridoxine (B), but not muscimol (C) or baclofen (D), prevent MMA-induced inhibition of GAD. Data are mean \pm S.E.M., N= 8-9 in each group. * P <0.05 compared to respective control physiological saline (SNK Test).

Figure 1

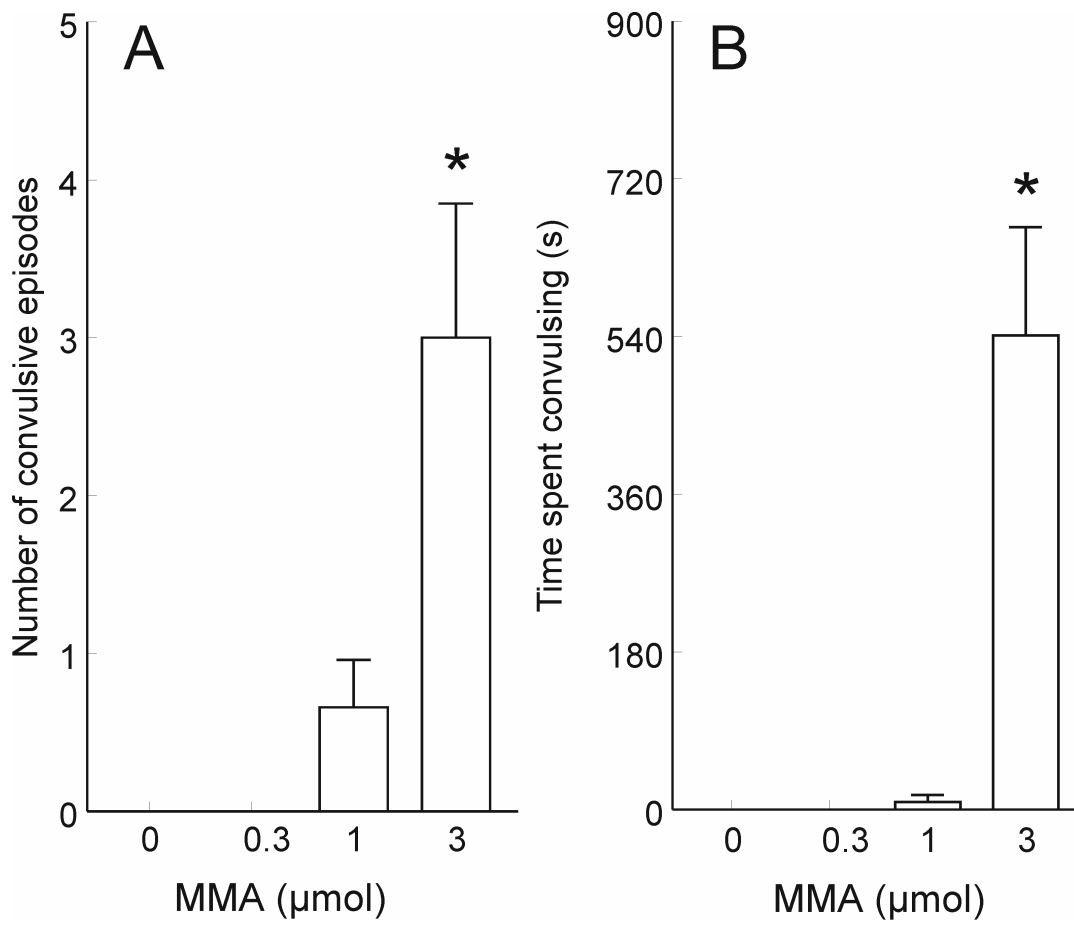


Figure 2

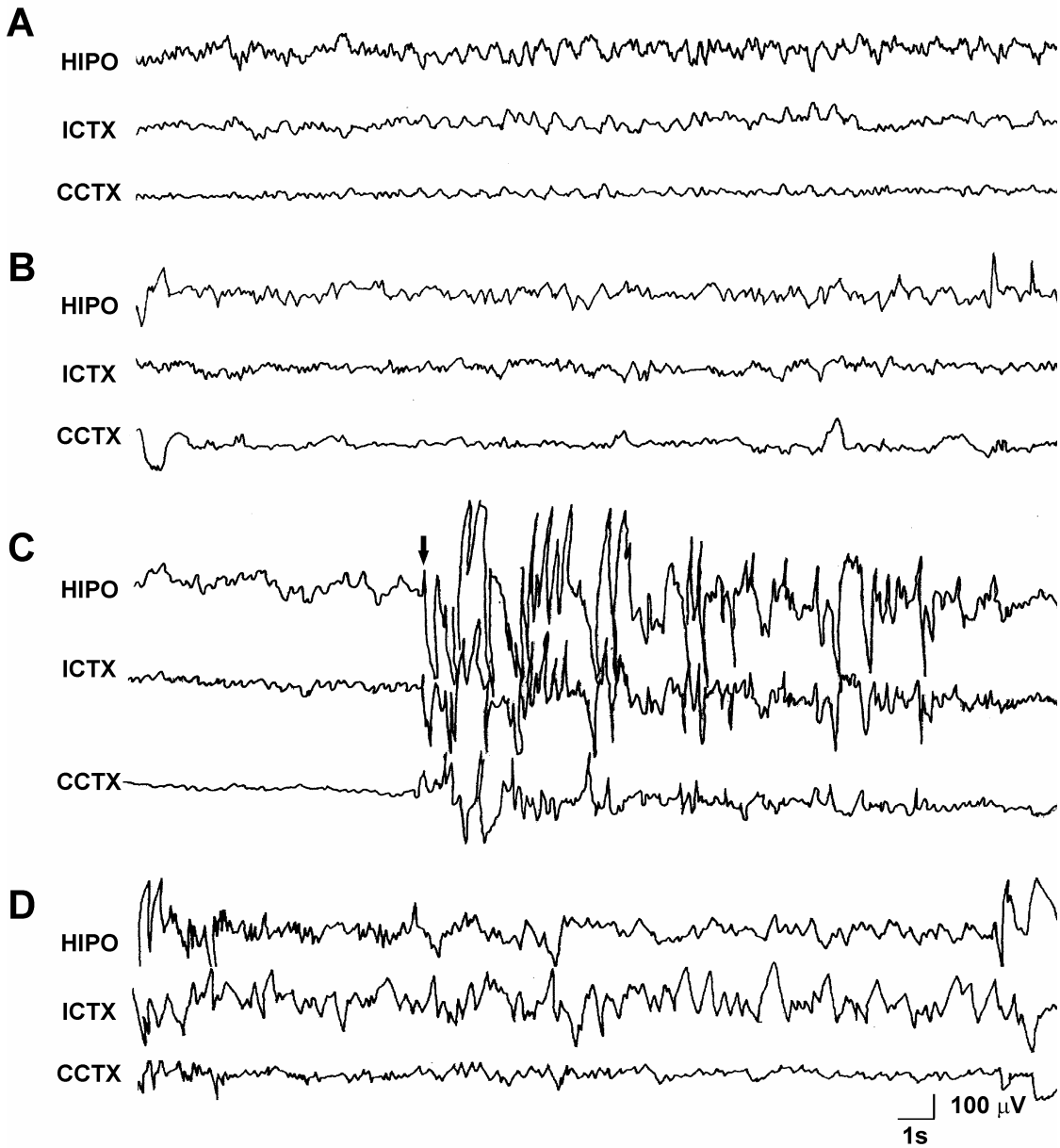


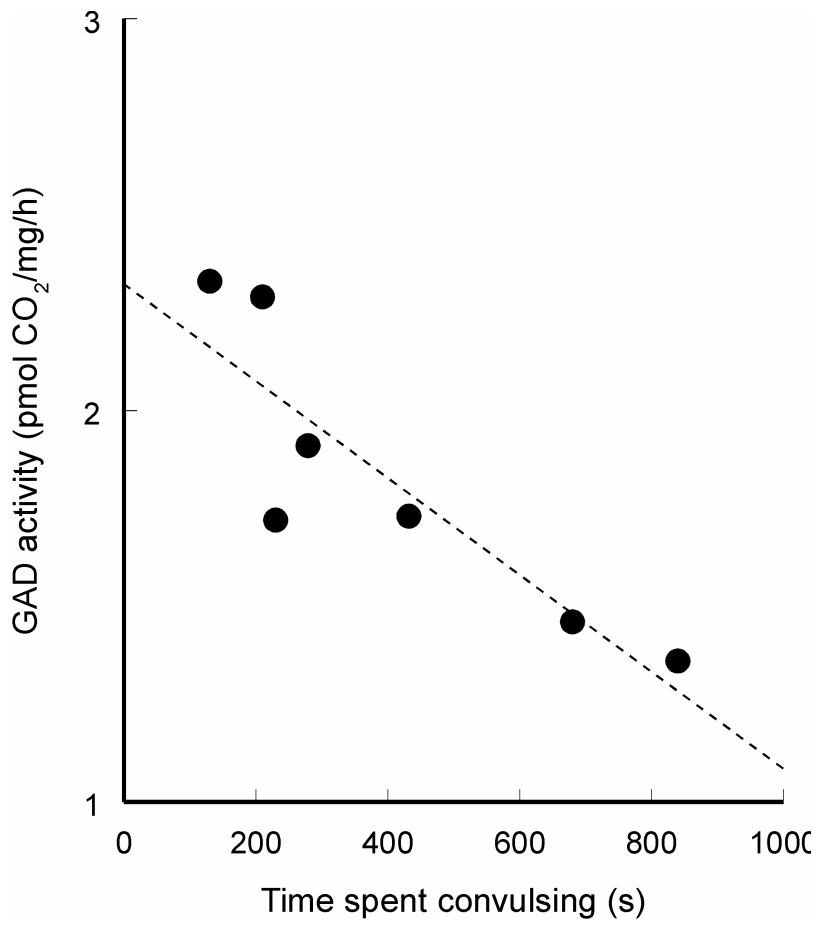
Figure 3

Figure 4

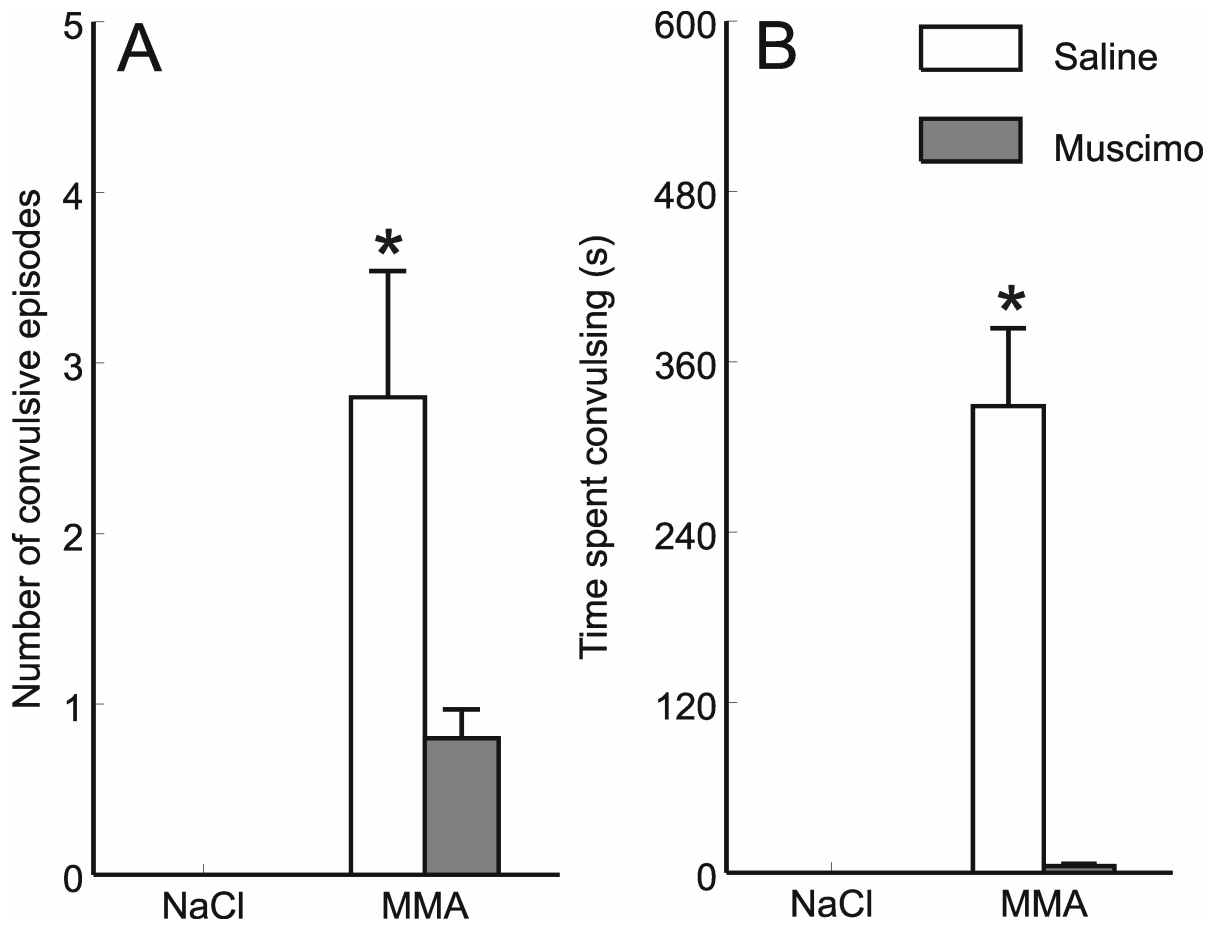


Figure 5

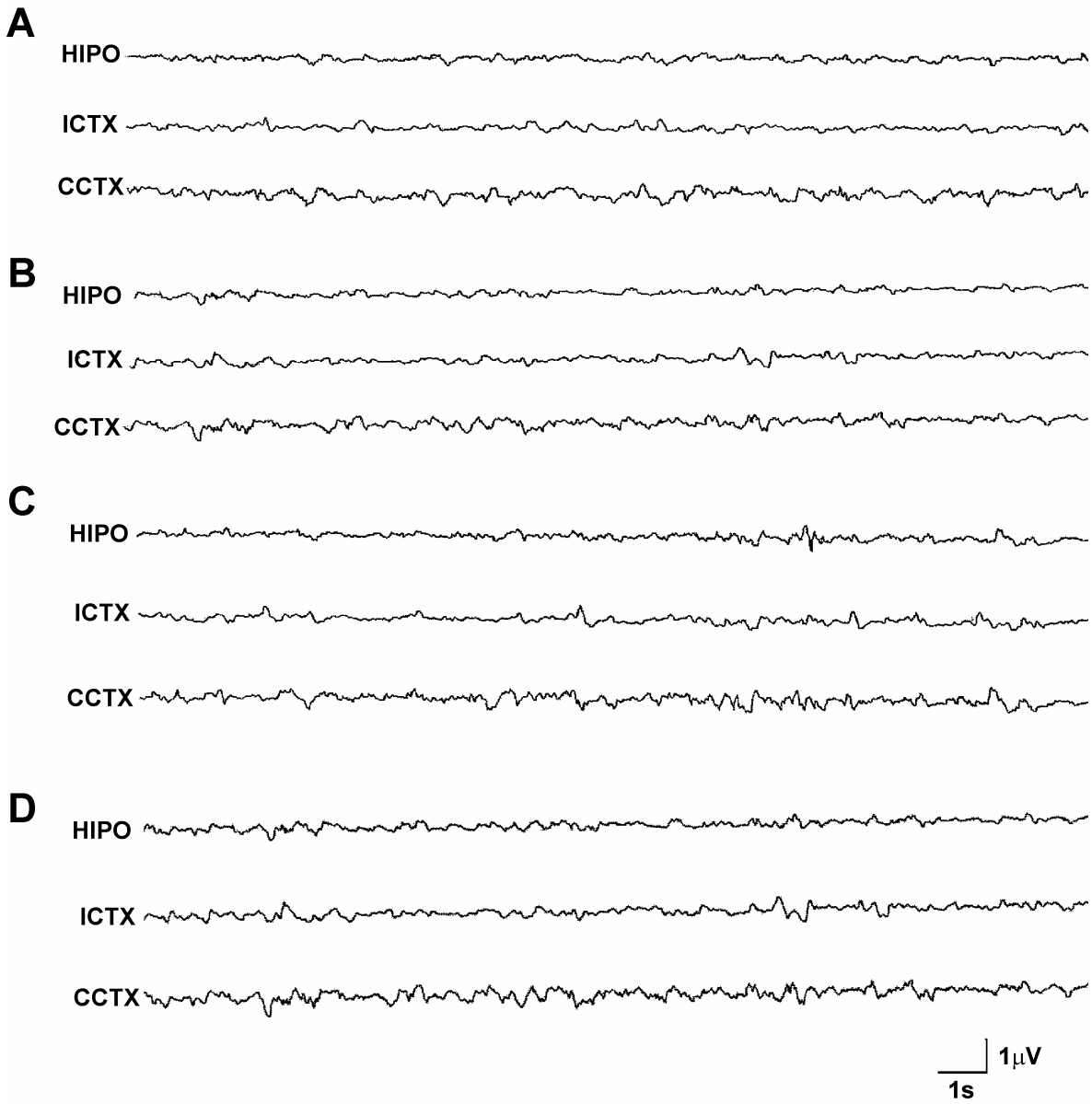


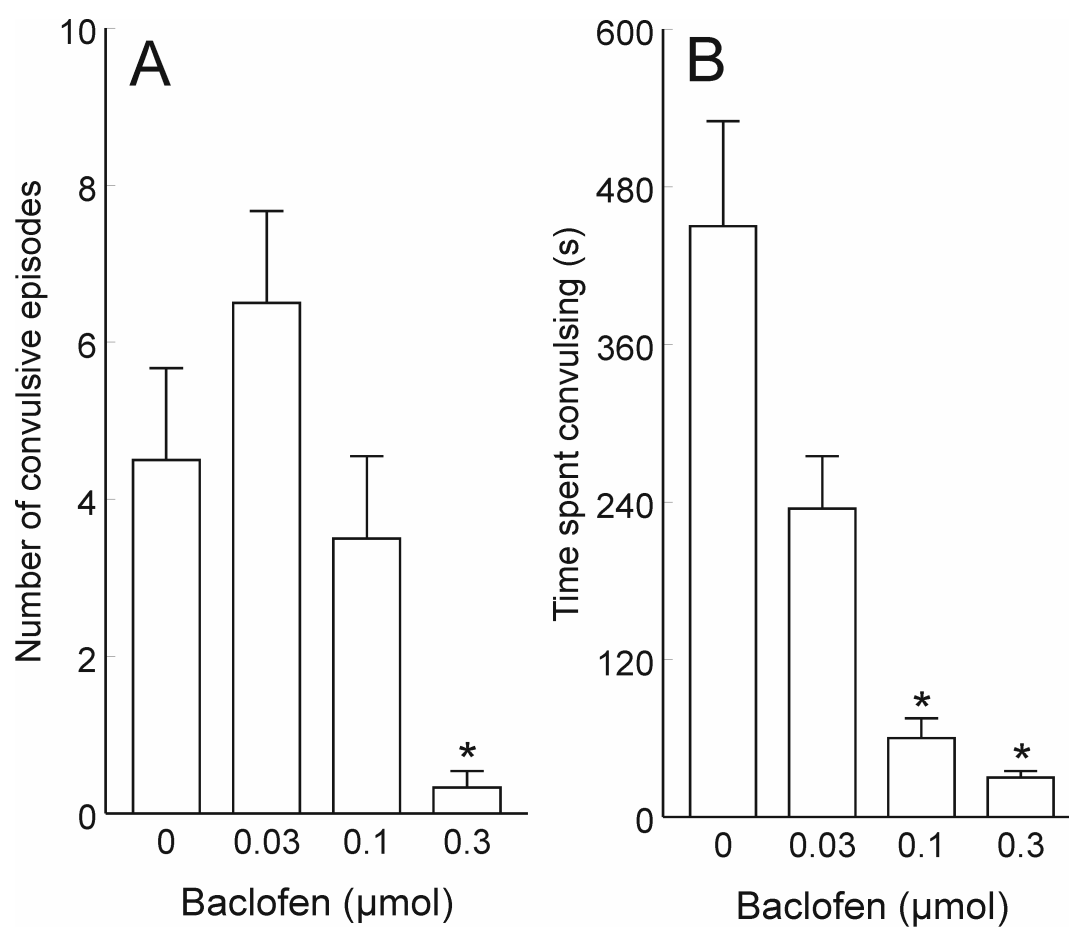
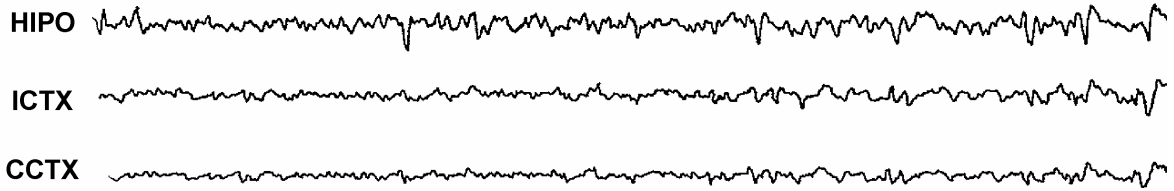
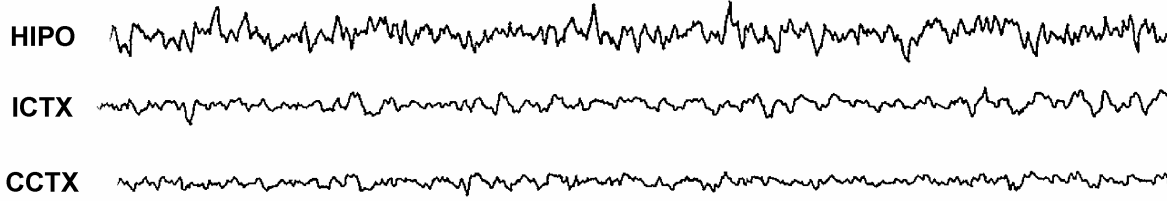
Figura 6

Figure 7

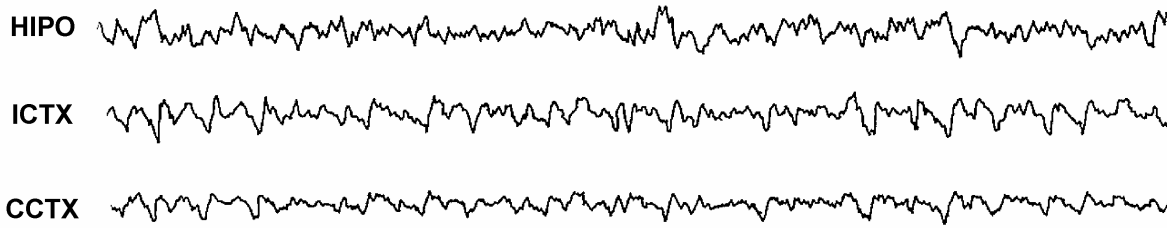
A



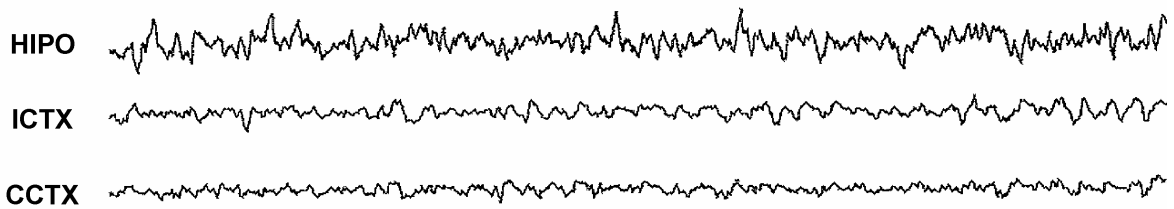
B



C



D



100 μ V
1 s

Figure 8

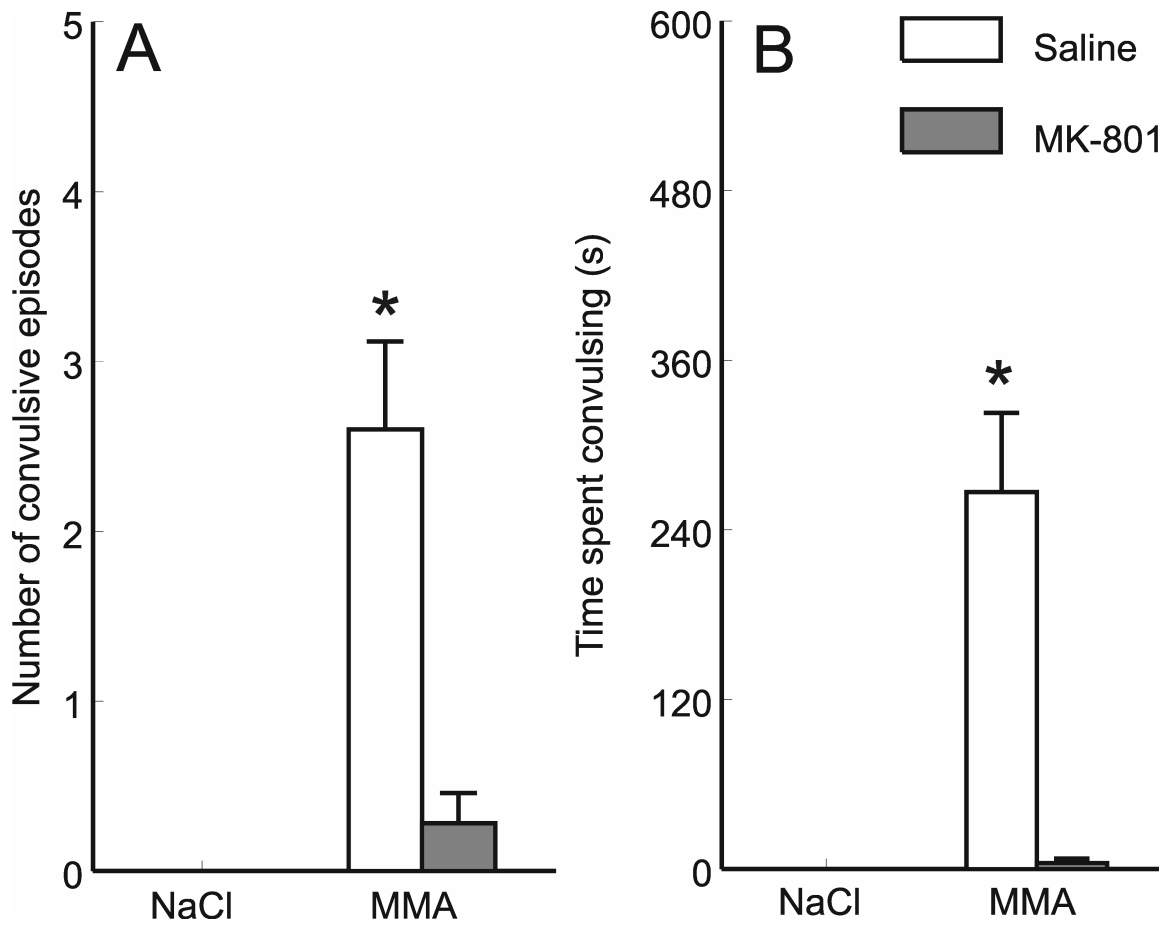


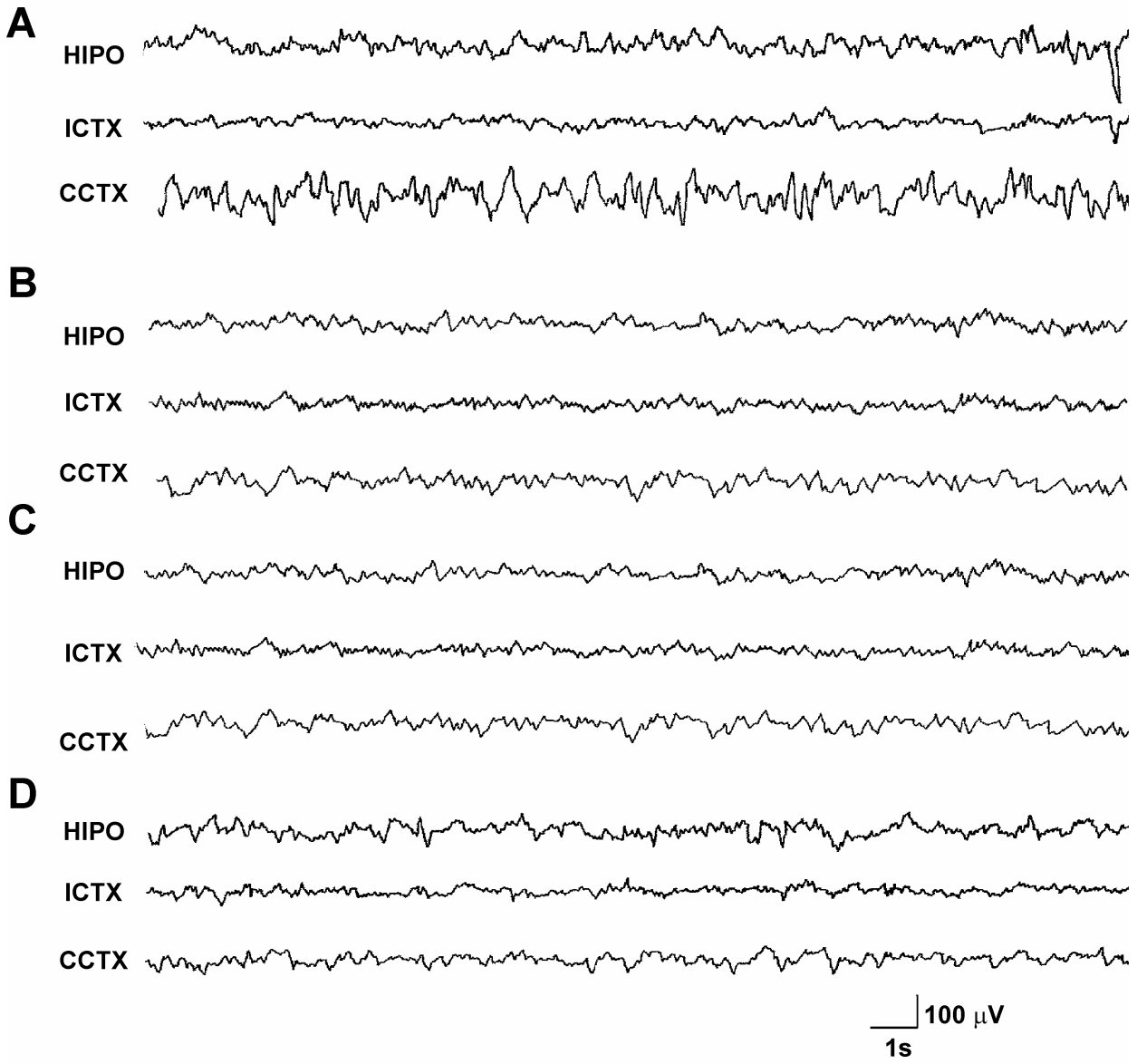
Figure 9

Figure 10

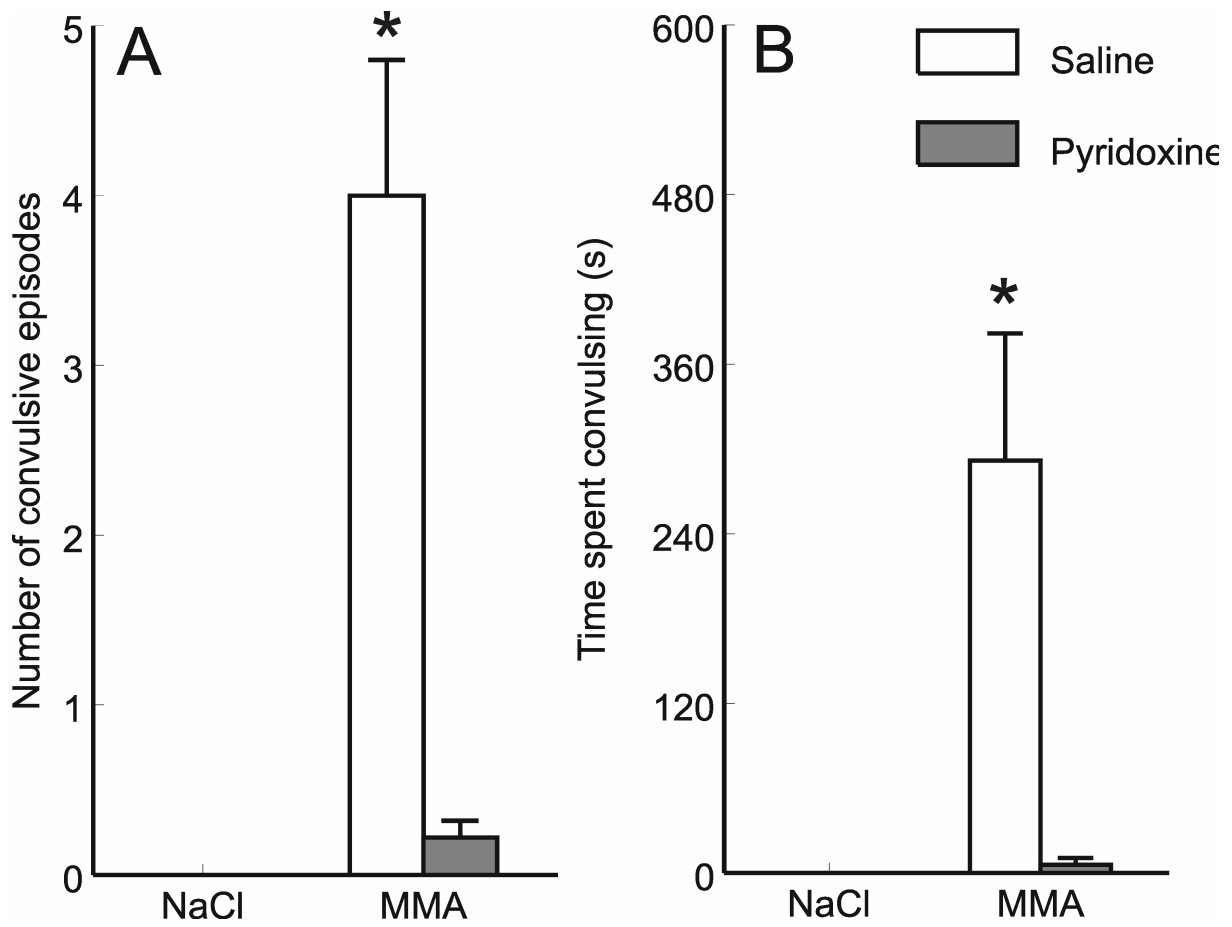
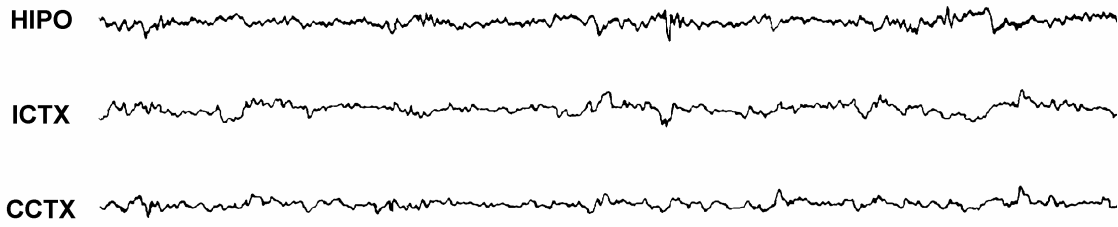
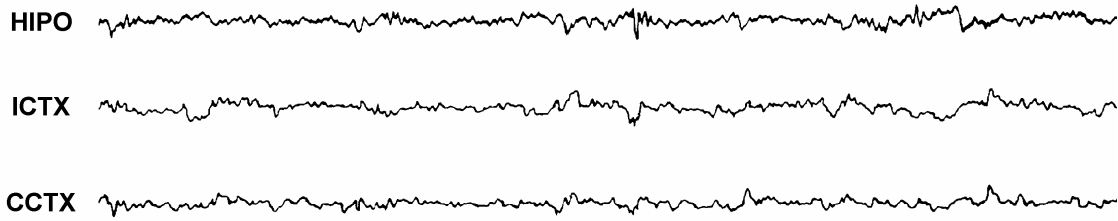
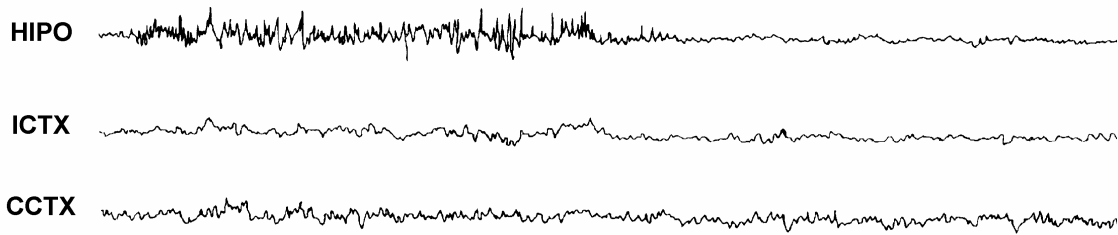
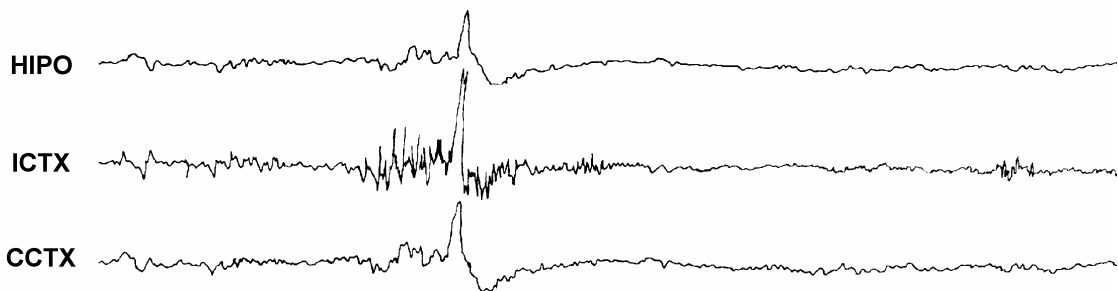
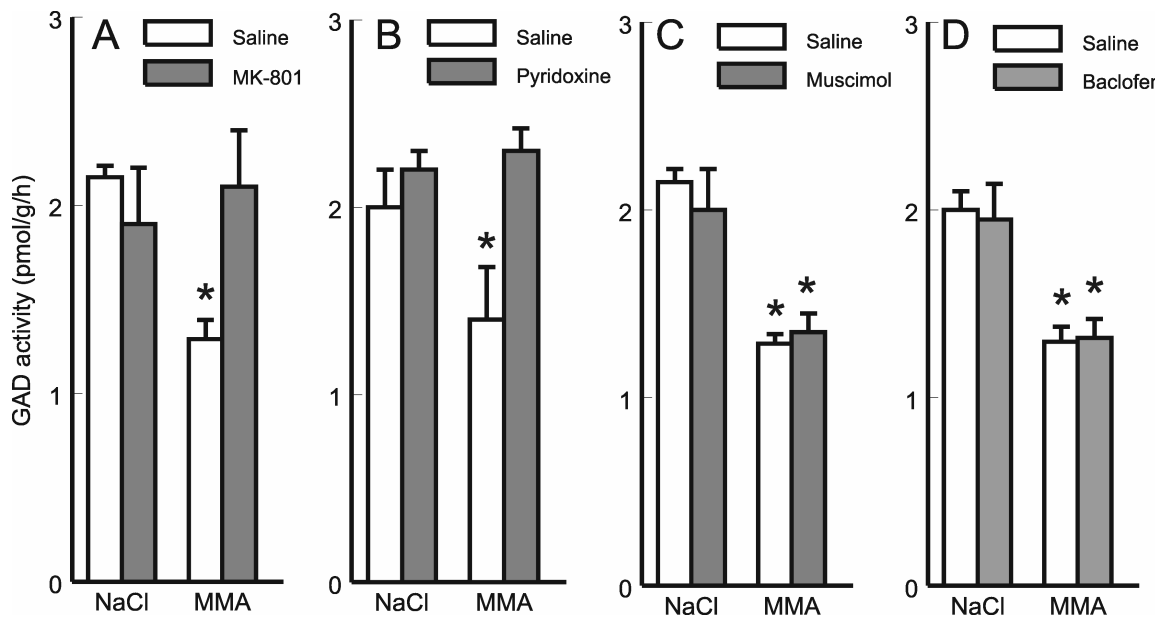


Figure 11

A**B****C****D**

100 μ V
1 s

Figure 12



CAPÍTULO III

DISCUSSÃO GERAL

III. Discussão Geral

No presente estudo, foi mostrado que a injeção intracerebroventricular de MMA induz convulsões e que piridoxina, baclofen (um agonista GABA_B) e muscimol (um agonista GABA_A) atenuam as convulsões induzidas pelo MMA. Além disso, foi mostrado que a duração das convulsões induzidas pelo MMA correlaciona-se com um decréscimo na atividade da GAD. O decréscimo na atividade da GAD induzida pelo MMA é atenuado pela administração prévia de piridoxina e MK-801 (antagonista de receptor NMDA), mas não por baclofen ou muscimol. A injeção de piridoxina, agonistas GABAérgicos ou MK-801 não alteraram a atividade da GAD nos animais injetados com NaCl, na ausência de MMA (animais controles, os quais não apresentaram convulsões).

Os sistemas de neurotransmissão glutamatérgico e GABAérgico têm sido considerados como essenciais para o desenvolvimento de convulsões. Sendo assim, tanto o comprometimento da função GABAérgica (Mody, 2004) como o excesso da função glutamatérgica podem predispor ao aparecimento de convulsões (Meldrum, 1995a, Meldrum, 1995b).

Estudos anteriores mostraram que receptores glutamatérgicos do tipo NMDA estão envolvidos nas convulsões e no dano oxidativo induzido pelo MMA (de Mello et al., 1996; Royes et al., 2006). De uma forma inovadora, o presente estudo mostra, pela primeira vez, o envolvimento de um mecanismo GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA.

No presente estudo, foram obtidas três linhas de evidências que sustentam o envolvimento de mecanismos GABAérgicos nas convulsões induzidas pelo MMA. A primeira está baseada nos estudos com agonistas GABAérgicos, que mostraram o

aumento do tônus GABAérgico pela injeção de baixas doses de agonistas GABA_A ou GABA_B com uma conseqüente redução nas convulsões induzidas pelo MMA. Desta forma, a prevenção das convulsões induzidas pelo MMA a partir de um restabelecimento farmacológico do tônus GABAérgico com agonistas, sugere que um decréscimo do tônus GABAérgico está envolvido na ação convulsivante do MMA. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, os quais mostraram que um decréscimo na função GABAérgica representa um fator desencadeante de episódios convulsivos (Galé, 1992; Wong et al., 2003). Como uma segunda linha de evidência, foi mostrado que a injeção de MMA induz um decréscimo (~40%) na atividade da GAD *ex vivo*, o qual correlacionou-se negativamente com a duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA. O decréscimo da atividade da GAD *ex vivo* representa uma evidência neuroquímica de que o MMA pode ser determinante para a redução do tônus GABAérgico, e prejudicar a síntese de GABA. Além disso, a existência de uma forte correlação entre a duração das convulsões induzidas pelo MMA com a inibição da GAD ($r=-0.873$; $p<0,01$), sugere que pode existir uma relação do tipo causa-efeito entre estes eventos. É interessante que a injeção de piridoxina, também reverteu as convulsões induzidas por metilmalonato. É sabido que a piridoxina se difunde facilmente pelas membranas celulares, transformando-se em um cofator essencial para a GAD, o piridoxal fosfato (Roger et al., 1994). De fato, o piridoxal fosfato ativa a GAD a partir de sua associação com a apoenzima, facilitando sua conversão para o complexo ativo holoenzima (Porter and Martin, 1986), o qual é mais resistente a inativação por aquecimento (Porter and Martin, 1988) e menos suscetível a inibição por outros agentes, com o aspartato, ATP e GABA (Porter and Martin, 1984; Porter and Martin, 1987). No presente estudo, foi evidenciado que a piridoxina protege a GAD da inibição induzida pelo MMA, ao mesmo tempo em que, reduz a duração e o número de episódios convulsivos induzidos pelo MMA. Conforme descrito acima, o predito

efeito protetor da piridoxina na GAD e das convulsões induzidas pelo MMA foi confirmado pelos nossos experimentos, reforçando o envolvimento da GAD nas convulsões induzidas pelo MMA.

Estudos anteriores mostraram que os distúrbios genéticos na expressão da GAD (Jardim et al., 1994; Kash et al., 1997) ou sua inibição por inibidores específicos e inespecíficos, levam ao aparecimento de convulsões (Abe and Matsuda, 1979, Arias et al., 1992, Davis et al., 2001, Netopilova et al., 2001). Como terceira e última linha de evidência, foi mostrado que a redução da atividade da GAD e as convulsões induzidas pelo MMA foram revertidas pelo MK-801 (antagonista do receptor NMDA).

Os resultados dos experimentos com MK-801 também levantaram uma possível causa para o decréscimo da atividade da GAD induzida pelo MMA. O MK-801 não previne somente as convulsões, mas também a inibição da GAD induzidas pelo MMA, o que suporta um envolvimento dos receptores NMDA em ambos os eventos. Além disso, sugere-se que a ativação dos receptores do tipo NMDA podem ter um papel central nas convulsões induzidas pelo MMA, na medida em que eles aumentam o tônus excitatório (aumento do fluxo de cálcio), com um conseqüente decréscimo do tônus inibitório.

O real mecanismo pelo qual o receptor NMDA medeia um decréscimo na atividade GAD ainda permanece desconhecido. No entanto, é bem conhecido que a ativação do receptor NMDA está acoplado a um influxo de Ca^{2+} , produção de NO^{\bullet} e geração de espécies reativas (Alano et al, 2002; Moncada and Bolanos, 2006). Sendo assim, é bem possível que o MMA esteja regulando a atividade da GAD por intermédio de pelo menos um destes mecanismos, desencadeados pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. De fato, evidências recentes sugerem que a GAD-65 é um substrato para a proteína quinase C (PKC), e pode ser ativada por fosforilação (Wei et al., 2004).

Além disso, a GAD-65 pode ser fosforilada por uma PKC independente de Ca^{2+} , o que leva a crer a provável existência de outro mecanismo de regulação dependente de Ca^{2+} seguramente diferente (Wei et al., 2004). A GAD-67 é também inibida por fosforilação, mas mediada por uma proteína quinase A independente de Ca^{2+} (Wei et al., 2004). No entanto, os resultados mostrados no presente estudo não estão de acordo com a literatura, na medida em que o aumento da concentração de Ca^{2+} aumentaria a atividade da GAD, o oposto do que foi verificado no presente estudo.

A ativação do receptor NMDA ativa quinases e fosfatases dependentes de Ca^{2+} , causa desacoplamento mitocondrial e produção de espécies reativas (Said et al., 2000, Alano et al., 2002, Sullivan et al., 2005). Em estudos anteriores, foi mostrado que o MMA induz lipoperoxidação e carbonilação protéica por intermédio da ativação do receptor NMDA (Royes et al., 2003; Royes et al., 2006). Desta forma, é bem possível que as modificações oxidativas induzidas pelo MMA estejam envolvidas na inibição da GAD apresentada neste estudo. Em relação ao que foi dito, foi mostrado anteriormente que a piridoxina (mesma dose usada no presente estudo) pode prevenir a formação de radicais livres e lipoperoxidação induzidas por peróxido de hidrogênio, sendo estes efeitos relacionados com modificações na função, integridade da membrana e estado redox mitocondrial (Kannan and Jain, 2004). Além disso, também foi mostrado que a GAD-65 e GAD-67 são extremamente sensíveis ao reagente sulfidrílico N-etil-maleimida, na medida em que ambas as enzimas possuem grupos de cisteína, os quais são cruciais para sua atividade e são um alvo potencial para o ataque de espécies reativas (Wei and Wu, 2005). Dentro desta mesma linha de evidência, tem sido mostrado que condições hiperbáricas induzem convulsões e redução na atividade da GAD e dos níveis de GABA no córtex (Morris et al., 1980). Além disso, foi mostrado anteriormente que a GAD é inibida pelo

óxido nítrico (Davis et al., 2001), e recentemente que o MMA induz aumento da produção de óxido nítrico (Furian et al., 2006). Sendo assim, é bem possível que o MMA esteja inibindo a GAD por mecanismos nitrérgicos.

Por fim, além dos resultados apresentados no presente estudo possuírem um caráter inovador a respeito do envolvimento do sistema GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA, também reforçam um envolvimento central dos receptores NMDA mediante as ações neuroquímicas desencadeadas pelo MMA, na medida que sua ativação desencadeia falhas no sistema GABAérgico. Estes resultados poderão repercutir em importantes implicações clínicas, sugerindo o uso de agentes GABAérgicos como coadjuvantes na terapia anticonvulsivante para pacientes portadores da acidemia metilmalônica.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

IV – CONCLUSÕES

IV.1. Conclusões Específicas

- A injeção intracerebroventricular de MMA injetado no ventrículo induz convulsões de maneira dose-dependente.
- A injeção intracerebroventricular de agonistas GABAérgicos GABAA (muscimol) ou GABA_B (baclofen) atenuam as convulsões induzidas pelo MMA.
- A injeção intracerebroventricular de um antagonista do receptor NMDA (MK-801) atenua as convulsões induzidas pelo MMA.
- A injeção intracerebroventricular de piridoxina (precursora de PLP e ativadora da GAD) atenuou as convulsões induzidas pelo MMA.
- A injeção intracerebroventricular de MMA reduziu a atividade da GAD no córtex
- Existe uma correlação negativa entre a atividade da GAD e duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA.
- A administração de muscimol ou baclofen não revertem a redução da atividade da GAD induzida pelo MMA.
- A administração de MK-801 reverteu totalmente à inibição da atividade da GAD induzida pelo MMA.
- A administração de piridoxina reverteu totalmente a redução da atividade da GAD induzida pelo MMA.

IV.2. Conclusão Geral

Diante dos resultados apresentados, o presente estudo demonstra, de forma pioneira, o envolvimento do sistema GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA. Neste estudo, mostramos que a redução da atividade da GAD induzida pela injeção de MMA é revertida somente por MK-801, mas não por muscimol ou baclofen. Além disso, sugerimos o envolvimento central dos receptores NMDA nas convulsões e redução da atividade da GAD induzidas pelo MMA, levando a uma conseqüentemente diminuição do tônus GABAérgico. Além disso, verificamos que a injeção de piridoxina, uma substância que é ativadora da GAD e ao mesmo tempo possui propriedades antioxidantes, protege tanto das convulsões quanto da inibição da GAD induzida pelo MMA. Assim, o envolvimento do sistema GABAérgico nas convulsões induzidas pelo MMA fica reforçado, na medida que a piridoxina caracteriza-se como uma potente ativadora da GAD, além de representar um mecanismo de defesa contra o ataque de espécies reativas geradas pela ação do MMA. Embora o corpo de resultados da presente tese aponte que existam falhas no sistema GABAérgico em decorrência das alterações neuroquímicas provocadas pela ação do MMA, existe a necessidade de aprofundar as investigações no sentido de caracterizar os mecanismos pelos quais o MMA induz falhas na transmissão GABAérgica, mais precisamente ao nível estrutural da GAD.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Nakanishi, K., Saito, H., 2000. The possible role of endogenous glutathione as an anticonvulsant in mice. *Brain Res.* 854, 235–238.
- Abe, M. and Matsuda, M., 1979. Effect of antivitamin B6 on regional GABA metabolism in mouse brain and its relation to convulsions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 25, 459-468.
- Alano, C. C., Beutner, G., Dirksen, R. T., Gross, R. A. and Sheu, S. S., 2002. Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J Neurochem.* 80, 531-538.
- [Albers RW](#), [Brady RO](#), 1959. The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey. *J Biol Chem.* 234(4):926-8.
- [Andre V](#), [Marescaux C](#), [Nehlig A](#), [Fritschy JM.](#), 2001. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus.* 11(4):452-68.
- [Arbilla S](#), [Kamal L](#), [Langer SZ](#), 1979. Presynaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol.* 1;57(2-3):211-7.
- Arias, C., Valero, H. and Tapia, R., 1992. Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups. *J Neurochem.* 58, 369-373.

- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K, 1996. Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun.* 24;229(3):891-5.
- Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* 187(1):35-9.
- Bacq ZM. 1975. Radiobiologic hazards of the peaceful use of nuclear energy. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 130(4-6):295-306.
- Bashkatova, V., Narkevich, V., Vitskova, G., Vanin, A., 2003. The influence of anticonvulsant and antioxidant drugs on nitric oxide level and lipid peroxidation in the rat brain during penthylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.* 27, 487–492.
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E., 2001. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet.* 28(1):46-8.
- Bazyan AS, Zhulin VV, Karpova MN, Klishina NY, Glebov RN., 2001. Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylenetetrazole challenge. *Brain Res.* 12;888(2):212-220.
- Beckman JK, Howard MJ, Greene HL. 1990. Identification of hydroxyalkenals formed from omega-3 fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 31;169(1):75-80.
- Bikjdaouene, L., Escames, G., Leon, J., Ferrer, J.M., Khaldy, H., Vives, F., Acuna-Castroviejo, D., 2003. Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin

administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. *J. Pineal Res.* 35, 54–60.

Bouilleret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM., 2000. Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 10(3):305-24.

Bowery NG, Hudson AL, Price GW, 1987. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 20(2):365-83.

Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Naquet R, 1987. Epileptogenic gamma-aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci Lett*. 10;74(1):75-80.

Brickell KL, Nicholson LF, Waldvogel HJ, Faull RL., 1999. Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA(A) receptor changes. *J Chem Neuroanat*. 17(2):75-97.

Brismar J, Ozand PT., 1994. CT and MR of the brain in the diagnosis of organic acidemias. Experiences from 107 patients. *Brain Dev*. 16 Suppl:104-24.

Brooks-Kayal AR, Jin H, Price M, Dichter MA., 1998. Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *J Neurochem*. 70(3):1017-28.

Brorson JR, Marcuccilli CJ, Miller RJ. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. 1995. *Stroke*. 26(7):1259-66.

Brusque, A. M., Rotta, L. N., Tavares, R. G., Emanuelli, T., Schwarzbald, C. V., Dutra, C. S., Wyse, A. T. D., Wannmacher, C. M. D., de Souza, D. O. G. and Wajner, M.,

2001. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Research*. 920, 194-201.

Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ, 1992. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 15;89(6):2115-9.

Burns SP, Iles RA, Saudubray JM, Chalmers RA. 1996. Propionylcarnitine excretion is not affected by metronidazole administration to patients with disorders of propionate metabolism. *Eur J Pediatr*. 155(1):31-5.

Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Greengard, P., Hipskind, R. A., Borrelli, E. and Bernardi, G., 2001. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *Journal of Neuroscience*. 21, 5110-5120.

Chen CH, Colon W, Myer YP, Martin DL. ATP's impact on the conformation and holoenzyme formation in relation to the regulation of brain glutamate decarboxylase. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Aug 15;380(2):285-93.

Chen CH, Wu SJ, Martin DL, 1998. Structural characteristics of brain glutamate decarboxylase in relation to its interaction and activation. *Arch Biochem Biophys*. 1;349(1):175-82.

Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C, 2001. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in

experimental epilepsy. *Nat Neurosci.* 4(1):52-62.

Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA., 2002. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2002 Jun;31(2):184-9. Epub 2002 May 6.

Couve A, Moss SJ, Pangalos MN., 2000. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci.* 6(4):296-312.

Davis K, Foos T, Wu JY, Schloss JV, 2001. Oxygen-induced seizures and inhibition of human glutamate decarboxylase and porcine cysteine sulfinic acid decarboxylase by oxygen and nitric oxide. *J Biomed Sci.* 8(4):359-64.

de Mello FG, 1984. GABA-mediated control of glutamate decarboxylase (GAD) in cell aggregate culture of chick embryo retina. *Brain Res.* 316(1):7-13.

de Mello, C. F., Begnini, J., Jimenez-Bernal, R. E., Rubin, M. A., de Bastiani, J., da Costa, E., Jr. and Wajner, M., 1996. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721, 120-125.

- de Oliveira DL, Horn JF, Rodrigues JM, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk S, 2004. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 20;1018(1):48-54.
- DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW, 1998. Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci.* 15;18(20):8505-14.
- Dirk R Jr, Thomas A, Li L, Lernmark A, Sherwin RS, De Camilli P, Solimena M, 1995. Targeting of the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase to intracellular organelles is mediated by its interaction with the NH2-terminal region of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *J Biol Chem.* 3;270(5):2241-6.
- Dutra, J. C., Dutra, C. S., Cardozo, S. E. C., Wannmacher, C. M. D., Sarkis, J. J. F. and Wajner, M., 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 16, 147-153.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ, 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* 7(1):91-100.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR, 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci.* 14(3 Pt 2):1834-55.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Tobin AJ, Houser CR, 1993. Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in

situ hybridization methods. *J Comp Neurol*. 15;331(3):339-62.

Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ, 1993. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res*. 15;34(6):689-706.

Fenton, W. A. and Rosenberg, L. E., 1995. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: C.G., S. et al. (Eds.), *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1423-1449.

Fenton, W.A., Gravel, R.A., Rosenblatt, D.S., 2001. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 2165–2193.

Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, Gonzalez-Rodriguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF. 1999. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport*. 13;10(10):2039-43.

Fisher RS, Alger BE., 1984. Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*. 4(5):1312-23.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. 2000. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport*. 28;11(3):541-4.

Frere RC, Macdonald RL, Young AB., 1982. GABA binding and bicuculline in spinal cord and cortical membranes from adult rat and from mouse neurons in cell culture. *Brain Res*. 22;244(1):145-53.

Fritschy JM, Brunig I., 2003. Formation and plasticity of GABAergic synapses:

physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther.* 98(3):299-323.

Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F., 1999. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int.* 34(5):435-45.

Furian, A. F., Figuera, M. R., Ferreira, A. P. O., Oliveira, M. S., Fiorenza, N. G., C., M. J., Petry, J. C., Coelho, R. C., Mello, C. F. and Royes, L. F., 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in the striatum. *Neurochem Int.* 50, 164-171.

Gahwiler BH, Maurer R, Wuthrich HJ., 1984. Pitrazepin, a novel GABAA antagonist. *Neurosci Lett.* 6;45(3):311-6.

Gale, K., 1992. Role of GABA in the genesis of chemoconvulsant seizures. *Toxicol Lett.* 64-65 Spec No, 417-428.

Gibbs JW 3rd, Shumate MD, Coulter DA., 1997. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J Neurophysiol.* 77(4):1924-38.

Gold BI, Simon JR, Roth RH, 1978. Glutamic acid decarboxylase activity in striatal slices: persistent increase following depolarization. *Life Sci.* 22(2):187-93.

Hayasaka K, Metoki K, Satoh T, Narisawa K, Tada K, Kawakami T, Matsuo N, Aoki T., 1982. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. *Tohoku J Exp Med.* 137(3):329-34.

- Heaulme M, Chambon JP, Leyris R, Wermuth CG, Biziere K., 1986. Specific binding of a phenyl-pyridazinium derivative endowed with GABAA receptor antagonist activity to rat brain. *Neuropharmacology*. 25(11):1279-83.
- Hill DR, Bowery NG, 1981. 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature*. 290(5802):149-52.
- Itoh M, Uchimura H, 1981. Regional differences in cofactor saturation of glutamate decarboxylase (GAD) in discrete brain nuclei of the rat. Effect of repeated administration of haloperidol on GAD activity in the substantia nigra. *Neurochem Res*. 6(12):1283-9.
- Jardim, L. B., Pires, R. F., Martins, C. E. S., Vargas, C. R., Vizioli, J., Kliemann, F. A. D. and Giugliani, R., 1994. Pyridoxine-dependent seizures associated with white matter abnormalities. *Neuropediatrics* 25, 259-261.
- Jayakumar AR, Sujatha R, Paul V, Asokan C, Govindasamy S, Jayakumar R, 1999. *Brain Res*. 7;837(1-2):229-35.
- Jenner P, Olanow CW. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 47(6 Suppl 3):S161-70.
- Jenner P. Presymptomatic detection of Parkinson's disease. 1993. *J Neural Transm Suppl*. 40:23-36.
- Johnston GA, 1996. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*. 1996;69(3):173-98.

- Johnston GA, 1996. GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.* 17(9):319-23.
- Jones EG, 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex.* 3(5):361-72.
- Kamphuis W, Wadman WJ, Buijs RM, Lopes da Silva FH, 1987. The development of changes in hippocampal GABA immunoreactivity in the rat kindling model of epilepsy: a light microscopic study with GABA antibodies. *Neuroscience.* 23(2):433-46.
- Kannan K, Jain SK., 2004. Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes. *Free Radic Biol Med.* 15;36(4):423-8.
- Kapur J, Lothman EW, DeLorenzo RJ., 1994. Loss of GABA_A receptors during partial status epilepticus. *Neurology.* 44(12):2407-8.
- Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D. and Baekkeskov, S., 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14060-14065.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B., 1998. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 17;396(6712):683-7.
- Knuesel I, Zuellig RA, Schaub MC, Fritschy JM., 2001. Alterations in dystrophin and utrophin expression parallel the reorganization of GABAergic synapses in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 13(6):1113-24.
- Kofler M, Kronenberg MF, Rifici C, Saltuari L, Bauer G., 1994. Epileptic seizures

associated with intrathecal baclofen application. *Neurology*. 44(1):25-7.

Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF. 2006. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol*. 201(1):165-71.

Krogsgaard-Larsen P, Nielsen EO, Curtis DR., 1984 Ibotenic acid analogues. Synthesis and biological and in vitro activity of conformationally restricted agonists at central excitatory amino acid receptors. *J Med Chem*. 27(5):585-91.

Kunig G, Leenders KL, Sanchez-Pernaute R, Antonini A, Vontobel P, Verhagen A, Gunther I. 2000. Benzodiazepine receptor binding in Huntington's disease: [¹¹C]flumazenil uptake measured using positron emission tomography. *Ann Neurol*. 47(5):644-8.

Lehmann H, Ebert U, Loscher W, 1996. Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats. *Neurosci Lett*. 5;212(1):41-4.

Leibel RL, Shih VE, Goodman SI, Bauman ML, McCabe ER, Zwerdling RG, Bergman I, Costello C, 1980. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology*. 30(11):1163-8.

Leonard JV, Walter JH, McKiernan PJ., 2001. The management of organic acidaemias: the role of transplantation. *J Inherit Metab Dis*. 24(2):309-11.

Lloyd KG, Bossi L, Morselli PL, Munari C, Rougier M, Loiseau H, 1986. Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv Neurol*. 44:1033-44.

Loscher, W. and Horstermann, D., 1994. Differential effects of vigabatrin, gamma-acetylenic GABA, aminooxyacetic acid, and valproate on levels of various amino

acids in rat brain regions and plasma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 349, 270-278.

Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM., 2000. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 15;20(14):5401-19.

Ludolph AC, Riepe M, Ullrich K. 1993. Excitotoxicity, energy metabolism and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 16(4):716-23.

Madl JE, Burgesser K. 1993. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 13(10):4429-44.

Malfatti, C. R. M., Royes, L. F. F., Francescato, L., Sanabria, E. R. G., Rubin, M. A., Cavalheiro, E. A. and Mello, C. F., 2003. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters

Marksteiner J, Sperk G, 1988. Concomitant increase of somatostatin, neuropeptide Y and glutamate decarboxylase in the frontal cortex of rats with decreased seizure threshold. *Neuroscience.* 26(2):379-85.

Martin DL and Rinvall K. 1993. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 1993 Feb;60(2):395-407.

Martin DL, Barke KE, 1998. Are GAD65 and GAD67 associated with specific pools of GABA in brain? *Perspect Dev Neurobiol.* 5(2-3):119-29.

Martin DL, Liu H, Martin SB, Wu SJ, 2000. Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem Int.* 37(2-3):111-9.

Martin DL, Martin SB, Wu SJ, Espina N, 1991. Regulatory properties of brain glutamate

decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J Neurosci*. 11(9):2725-31.

McDonald JW, Schoepp DD., 1993. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*. 624(1-2):239-44.

McLaughlin, B. A., Nelson, D., Silver, I. A., Erecinska, M. and Chesselet, M. F., 1998. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience*. 86, 279-290.

Meldrum BS, 1975. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol*. 17:1-36.

Meldrum, B. S., 1995b. Excitatory amino acid receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci*. 757, 492-505.

Meldrum, B., 1995a. Epilepsy. Taking up GABA again. *Nature* 376, 122-123.

Mercugliano M, Soghomonian JJ, Qin Y, Nguyen HQ, Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ, Chesselet MF, 1992. Comparative distribution of messenger RNAs encoding glutamic acid decarboxylases (Mr 65,000 and Mr 67,000) in the basal ganglia of the rat. *J Comp Neurol*. 15;318(3):245-54.

Miller LP, Walters JR, 1979. Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra synaptosomes. *J Neurochem*. 33(2):533-9.

Miller LP, Walters JR, Martin DL, 1977. Post-mortem changes implicate adenine nucleotides and pyridoxal-5' -phosphate in regulation of brain glutamate decarboxylase. *Nature*. 28;266(5605):847-8.

Mody, I., 2004. Another "tonic" in the realm of epilepsy. *Epilepsy Curr*. 4, 248-249.

Moncada, S. and Bolanos, J. P., 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and

neurodegeneration. *J Neurochem.* 97, 1676-1689.

Morris, D. F., Haya, K., Zempel, J. A. and Schowen, R. L., 1980. GABA metabolism in O₂-induced convulsions. *Brain Res Bulletin.* 5, 789-792.

Namchuk M, Lindsay L, Turck CW, Kanaani J, Baekkeskov S, 1997. Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65alpha. *J Biol Chem.* 17;272(3):1548-57.

Narasimhan, P., Sklar, R., Murrell, M., Swanson, R. A. and Sharp, F. R., 1996. Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid. *Journal of Neuroscience.* 16, 7336-7346.

Nathanson JA, Scavone C, Scanlon C, McKee M. 1995. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron.*14(4):781-94.

Netopilova, M., Haugvicova, R., Kubova, H., Drsata, J. and Mares, P., 2001. Influence of convulsants on rat brain activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. *Neurochem Res.* 26, 1285-1291.

Nobrega JN, Kish SJ, Burnham WM., 1990. Regional brain [3H]muscimol binding in kindled rat brain: a quantitative autoradiographic examination. *Epilepsy Res.* 6(2):102-9.

Ogier de Baulny H, Saudubray JM. 2002. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol.* 2002 7(1):65-74.

Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F.F., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Fiorenza, N.G., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions

biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.

Pavlakovic G, Kane MD, Eyer CL, Kanthasamy A, Isom GE. 1995. Activation of protein kinase C by trimethyltin: relevance to neurotoxicity. *J Neurochem*. 65(5):2338-43.

Peltola J, Kulmala P, Isojarvi J, Saiz A, Latvala K, Palmio J, Savola K, Knip M, Keranen T, Graus F, 2000. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with therapy-resistant epilepsy. *Neurology*. 12;55(1):46-50

Peters A, Kara DA. 1895. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. *J Comp Neurol*. 8;234(2):242-63.

Plaitakis A, Constantakakis E.1993. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull*. 30(3-4):381-6.

Porter, T. G., Martin, D. L., 1984. Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem*. 43, 1464-1467.

Porter, T. G., Martin, D. L., 1986. Non-steady-state kinetics of brain glutamate decarboxylase resulting from interconversion of the apo- and holoenzyme. *Biochim Biophys Acta* 874, 235-244.

Porter, T. G., Martin, D. L., 1987. Rapid inactivation of brain glutamate decarboxylase by aspartate. *J Neurochem*. 48, 67-72.

Porter, T. G., Martin, D. L., 1988. Stability and activation of glutamate apodecarboxylase from pig brain. *J Neurochem*. 51, 1886-1891.

Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW., 2002. Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab*.

22(12):1463-75.

Ribak CE, Hunt CA, Bakay RA, Oertel WH, 1986. A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci. *Brain Res.* 15;363(1):78-90.

Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A., 2002. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 112(1):101-11

Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Kriegstein J, Mello CF., 2005. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 66(1-3):185-94.

Rimvall K, Martin DL, 1994. The level of GAD67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal gamma-aminobutyric acid levels. *J Neurochem.* 62(4):1375-81.

Rinne UK, Laaksonen H, Riekkinen P, Sonninen V, 1974. Brain glutamic acid decarboxylase activity in Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 12(1):13-9.

Roberts E and Frankel S. 1951. Glutamic acid decarboxylase in brain. *J Biol Chem.* 188(2):789-95.

Robitaille Y, Kemball K, Sherwin AL, 1995. beta-alanine uptake is upregulated in FeCl₃-induced cortical scars. *J Neurol Sci.* 134 Suppl:95-101.

Rogers KS, Mohan C., 1994. Vitamin B6 metabolism and diabetes. *Biochem Med Metab Biol.* 52, 10-7.

Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J,

Frussa-Filho R, Mello CF. 2005. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett.* 11;376(2):116-20.

Royes, L. F. F., Figuera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Myskiw, J. D., Fiorenza, N. G., Petry, J. C., Coelho, R. C. and Mello, C. F., 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav.* 83, 136-144.

Said, S. I., Pakbaz, H., Berisha, H. I. and Raza, S., 2000. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 28, 1300-1302.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. and Tapia, R., 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-aminobutyric acid. *Neurochem Int.* 24, 363-368.

Scheyer, R. D., 1998. Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog Brain Res.* 116, 359-369.

Schloss JV, 2002. Oxygen toxicity from plants to people. *Planta.* 216(1):38-43.

Schuck, P. F., Rosa, R. B., Pettenuzzo, L. F., Sitta, A., Wannmacher, C. M. D., Wyse, A. T. S. and Wajner, M., 2004. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochemistry International.* 45, 661-667.

Schwarzer C, Sperk G, 1995. Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience.* 69(3):705-9.

Schwarzer C, Tsunashima K, Wanzenbock C, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G. 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic

acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 80(4):1001-17

Sheikh SN, Martin DL, 1996. Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum. *J Neurochem*.66(5):2082-90.

Sheikh SN, Martin SB, Martin DL, 1999. Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochem Int*. 35(1):73-80

Sherif FM, Ahmed SS, 1995. Basic aspects of GABA-transaminase in neuropsychiatric disorders. *Clin Biochem*. 28(2):145-54.

Shi Y, Veit B, Baekkeskov S, 1994. Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65. *J Cell Biol*. 124(6):927-34.

Siesjo BK., 1981. Measurements of cerebral oxygen consumption: advantages and limitations. *Eur Neurol*. 20(3):194-9.

Simmonds MA., 1980. Evidence that bicuculline and picrotoxin act at separate sites to antagonize gamma-aminobutyric acid in rat cuneate nucleus. *Neuropharmacology*. 19(1):39-45.

Sloviter RS, 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*. 2;235(4784):73-6.

Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL, 1996. Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 30;373(4):593-618.

Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. 1992. *Sci Am*. 266(5):68-71, 74-7.

- Snyder SH, Sabatini DM. 1995. Immunophilins and the nervous system. *Nat Med.* 1(1):32-7
- Soghomonian JJ, Martin DL, 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* 19(12):500-5.
- Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, Comi GC, Pozza G, De Camilli P, Vicari AM, 1988. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 21;318(16):1012-20.
- Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O, 1983. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience.* 10(4):1301-15.
- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W., 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience.* 80(4):987-1000.
- Sperk G., 1994. Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol.* 42(1):1-32.
- Sullivan, P. G., Rabchevsky, A. G., Waldmeier, P. C. and Springer, J. E., 2005. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res.* 79, 231-239.
- Swanson RA, Farrell K, Simon RP. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995 May;15(3):417-24.

- Tapia R, Sandoval ME, Contreras P, 1975. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem.* 24(6):1283-5.
- Tillakaratne NJ, Medina-Kauwe L, Gibson KM, 1995. gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 112(2):247-63.
- Titulaer MN, Ghijssen WE, Kamphuis W, De Rijk TC, Lopes da Silva FH., 1995. Opposite changes in GABAA receptor function in the CA1-3 area and fascia dentata of kindled rat hippocampus. *J Neurochem.* 1995 64(6):2615-21.
- Toyoshima, S., Watanabe, F., Saido, H., Miyatake, K. and Nakano, Y., 1995. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *Journal of Nutrition.* 125, 2846-2850.
- Treacy E, Arbour L, Chessex P, Graham G, Kasprzak L, Casey K, Bell L, Mamer O, Scriver CR. 1996. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. *J Pediatr.* 129(3):445-8.
- Treiman, D. M., 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia.* 42 Suppl 3, 8-12.
- Ueno H, 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 10:67-79.
- Umemura A, Mabe H, Nagai H. 1992. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. *Stroke.* 23(8):1163-6.
- Wajner M, Raymond K, Barschak A, Luft AP, Ferreira G, Domingues G, Chiochetta M, Sirtori L, Goulart L, Pulrolnik V, Pires R, Grillo E, Lohr A, Funayama C, Sanseverino MT, Longuercio-Leite JC, Coelho JC, Giugliani R, Regla-Vargas C. 2002. Detection

of organic acidemias in Brazil. *Arch Med Res.* 33(6):581-5.

Wajner, M., Dutra, J. C., Cardoso, S. E., Wannmacher, C. M. D. and Motta, E. R., 1992. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 15, 92-96.

Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF., 2001. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet.* 28(1):49-52.

Wei, J. and Wu, J. Y., 2005. Structural and functional analysis of cysteine residues in human glutamate decarboxylase 65 (GAD65) and GAD67. *J Neurochem.* 93, 624-633.

Wei, J., Davis, K. M., Wu, H. and Wu, J. Y., 2004. Protein phosphorylation of human brain glutamic acid decarboxylase (GAD)65 and GAD67 and its physiological implications. *Biochemistry* 43, 6182-6189.

Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Aug;20(8):1149-65.

Wojcik WJ, Ulivi M, Paez X, Costa E, 1989. Islet-activating protein inhibits the beta-adrenergic receptor facilitation elicited by gamma-aminobutyric acidB receptors. *J Neurochem.* 53(3):753-8.

Wong, C. G., Bottiglieri, T. and Snead, O. C., 3rd, 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol.* 54 Suppl 6, S3-12.

Wood, J. D. and Peesker, S. J., 1973. The role of GABA metabolism in the convulsant and

anticonvulsant actions of aminooxyacetic acid. *J Neurochem.* 20, 379-387.

Wyse, A. T. S., Streck, E. L., Barros, S. V. T., 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.

Zeevalk GD, Manzino L, Sonsalla PK. Protection of malonate-induced GABA but not dopamine loss by GABA transporter blockade in rat striatum. *Exp Neurol.* 2002 Jul;176(1):193-202.

ANEXO

View Letter

Date: Mar 17, 2007

To: "Carlos Fernando Mello" cf.mello@smail.ufsm.br

cc: asla.pitkanen@uku.fi

From: "Neuroscience, Editorial" neuroscience@journal-office.com

Subject: Acceptance of NSC-06-1377R1

Ms. No.: NSC-06-1377R1

Title: Convulsions Induced by Methylmalonic Acid are Associated with Glutamic Acid Decarboxylase Inhibition in Rats: A Role for GABA in the Seizures Presented by Methylmalonic Acidemic Patients?

Dear Dr. Mello,

We are pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Neuroscience. We hope that the review has been a positive experience and that your manuscript has been improved by the process.

Many thanks for submitting your fine paper to Neuroscience. We look forward to receiving additional papers from your laboratory in the future.

Kind regards,

Dr. Ole Petter Ottersen
Chief Editor
Neuroscience

Dr. Asla Pitkanen
Section Editor
Neuroscience

NEUROSCIENCE LAUNCHES COVER COMPETITION!

Neuroscience once again invites all authors whose papers have been accepted for publication in the journal in 2007 to enter a competition for the best cover.

A new color cover will be chosen for each of the 28 issues of 'Neuroscience' in 2007. All covers for 2007 will be posted on the IBRO web site www.ibro.org in early 2008, when IBRO members will be invited to vote for the best cover for 2007!

The winner will receive \$1000 worth of books from Elsevier Science.

Illustrations for the cover should be related to the author's submitted article, but would not necessarily be included in the paper. We invite authors to produce exciting graphical images that represent the subject matter of their accepted article. Cover art should be sent to:

Trisha Stucker & Katie Gagnet
Journal Managers
Neuroscience
Email: Neuroscience@journal-office.com

When art is submitted, please insure that the manuscript reference number is included on all materials. Covers should be submitted in digital format. Cover art should be color, formatted for the entire 8 1/2 X 11 inch cover, and should be submitted in a resolution of at least 300 dpi. Covers can be submitted as TIFF, PDF, JPEG or PowerPoint formats.