

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

Mayara Lütchemeyer de Freitas

**CONSEQUÊNCIAS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA
Na⁺, K⁺ - ATPase NA EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA**

Santa Maria, RS
2018

Mayara Lütchemeyer de Freitas

**CONSEQUÊNCIAS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA
Na⁺, K⁺ - ATPase NA EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2018

Freitas, Mayara Lütchemeyer de
Consequências da modulação farmacológica da Na⁺, K⁺ -
ATPase na epilepsia induzida por pilocarpina / Mayara
Lütchemeyer de Freitas.- 2018.
73 p.; 30 cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

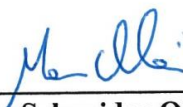
1. Epilepsia 2. Na⁺, K⁺ - ATPase 3. DRSSAb 4. Agrina
5. Hipereexcitabilidade I. Oliveira, Mauro Schneider II.
Título.

Mayara Lütchemeyer de Freitas

**CONSEQUÊNCIAS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA
Na⁺, K⁺ - ATPase NA EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovado em 24 de agosto de 2018:



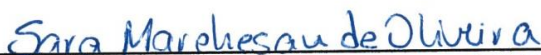
Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)




Gustavo Petri Guerra, Dr. (UNIPAMPA)



Marcel Henrique Marcondes Sari, Dr. (UFSM)



Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)



Vinícius Rafael Funck, Dr. (PITÁGORAS)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Poder Maior Que Gera a Vida pela oportunidade de estar aqui. E aos meus Guias Espirituais pela ajuda na condução do meu caminho.

Agradeço ao meu querido Pai, Antônio, que hoje se faz luz por mostrar-se eternamente presente.

Agradeço imensamente a minha Mãe, Rosangela, pela compreensão, palavras e “ouvidos” de apoio, por ser essa figura extremamente pacifista que me ensina a cada dia mais sobre o amor ao próximo.

Agradeço a minha irmã, Ingra, pessoa iluminada da qual tenho o maior orgulho que faz a minha vida mais feliz e leve.

Agradeço carinhosamente ao meu namorado, Luan, por todo apoio, carinho, amor e paciência. “Meu riso é tão feliz contigo”.

Agradeço ao meu orientador, Mauro, pelo conhecimento repassado, esforço e preocupação na condução dos trabalhos. Sempre disposto a ajudar, és uma inspiração pela inteligência, competência e humildade.

Agradeço aos colegas de laboratório LabNeuro em especial a Fernanda, a Profe Ana e seus orientados, aos colegas do Bioex, ao Professor Carlos e seu grupo. Todos ajudaram a desenvolver esse trabalho de alguma forma e fazem parte dele.

Agradeço aos colegas do laboratório do Professor David que fizeram parte dessa etapa durante o sanduíche, por um curto e marcante período. Pessoas especiais com quem aprendi muito.

Agradeço a todos meus amigos. Cada um traz um sentido especial a minha vida e agradeço por estarem no meu caminho.

Agradeço a banca em avaliar e contribuir para o trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, assim como a todos os professores e funcionários do departamento.

Agradeço o apoio financeiro prestado pelas instituições de fomento, CAPES, FAPERGS e CNPq.

RESUMO

CONSEQUÊNCIAS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA Na^+ , K^+ - ATPase NA EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA

AUTORA: Mayara Lütchemeyer de Freitas

ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

A epilepsia é uma das doenças neurológicas crônicas mais comum em todo o mundo, e apesar da diversidade de medicamentos disponíveis na prática clínica, um terço dos pacientes continuam não respondendo as terapias. Além disso, ao considerarmos os efeitos adversos das terapias disponíveis, as comorbidades da epilepsia, os custos socioeconômicos para saúde pública e a necessidade de elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem a doença, concluímos que há grande necessidade do contínuo desenvolvimento das pesquisas em epilepsia. A Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) é uma enzima importante na regulação da excitabilidade neuronal, e um interessante alvo farmacológico a ser explorado na epilepsia. Evidências indicam que o prejuízo na atividade da NKA contribui para crises epiléticas em camundongos e em humanos com epilepsia. A fim de avaliar novas ferramentas farmacológicas que modulem a atividade da NKA, o presente estudo procurou identificar alguns efeitos do anticorpo DRSSAb, capaz de ativar a atividade da NKA, e da agrina, proteína que parece estar associada com efeitos inibitórios sobre a NKA, em um modelo experimental de epilepsia. Para isso, camundongos adultos machos C57BL/6 foram submetidos ao estado de mal epilético (SE) através da administração de repetidas doses de pilocarpina, e após um período esses animais passam a apresentar crises convulsivas espontâneas e recorrentes. Nos experimentos *in vitro* as fatias hipocâmpais de camundongos epiléticos e controles foram tratadas com DRSSAb. Obteve-se uma melhora na captação de glicose de aproximadamente 30% nas fatias dos animais epiléticos em contato com o DRSSAb. A liberação de glutamato aumentou em 83% nas fatias dos animais epiléticos, e diminuiu aos níveis dos animais controles com o tratamento do DRSSAb. Os resultados foram obtidos sem interferir na viabilidade celular. Nos experimentos *in vivo*, a administração intrahipocâmpal do DRSSAb reestabeleceu a atividade de cruzamentos no teste de campo aberto; o número de cruzamentos diminuiu a metade nos animais tratados com pilocarpina, e foram reestabelecidos aos níveis do grupo controle após tratamento com DRSSAb. Quanto a agrina, os níveis de expressão proteica após o SE em hipocampo de camundongos não foram alterados em 24 horas. Porém, 14 dias após o SE houve uma diminuição na expressão da agrina, seguida de um aumento em 71% 60 dias após o SE. A administração intrahipocâmpal de agrina aumentou a susceptibilidade a crises epiléticas em animais SE, mas não em camundongos controles. Em resumo, os dados desta tese dão suporte para a hipótese que o anticorpo DRSSAb e a agrina são promissoras estratégias terapêuticas na busca de novos tratamentos para epilepsia.

Palavras-chave: Epilepsia. Na^+ , K^+ -ATPase. DRSSAb. Agrina. Hiperexcitabilidade. Excitotoxicidade.

ABSTRACT

CONSEQUENCES OF PHARMACOLOGICAL MODULATION OF Na⁺, K⁺ - ATPase IN PILOCARPINE-INDUCED EPILEPSY

AUTHOR: Mayara Lütchemeyer de Freitas

ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

Epilepsy is one of the most common chronic neurological diseases worldwide, and despite a variety of drugs introduced into clinical practice, one-third of patients remain unresponsive to therapies. In addition, when considering the adverse effects therapies, epilepsy comorbidities, socioeconomic costs for public health, and the need for understanding molecular mechanisms involved in the disease, we conclude that epilepsy research is of fundamental importance. Na⁺, K⁺ -ATPase (NKA) is an important enzyme in the regulation of neuronal excitability, and an interesting pharmacological target to be explored in epilepsy. Evidence indicates that impairment in NKA activity contributes to epileptic seizures in mice and in humans with epilepsy. In order to evaluate new pharmacological tools that modulate NKA activity, the present study sought to identify some effects of the DRSSAb antibody, capable of activating NKA activity, and agrin, a protein that appears to be associated with inhibitory effects on NKA, on an experimental model of epilepsy. To this purpose, male C57BL/6 mice were subjected to status epilepticus (SE) by administration of repeated low doses of pilocarpine, and after a period these animals had spontaneous and recurrent seizures. In the *in vitro* experiments the hippocampal slices of control and epileptic mice were treated with DRSSAb. Glucose uptake improved by approximately 30% in the slices of epileptic animals after treatment with DRSSAb. Glutamate release increased by 83% in slices from epileptic animals, and returned to levels of control animals after treatment with DRSSAb. These results were obtained without interfering with cell viability. In the *in vivo* experiments, the intrahippocampal administration of DRSSAb restored crossing activity in the open field test; the number of crossings decreased in epileptic animals, and returned to the levels of the control group after DRSSAb treatment. Regarding agrin, the levels of protein expression after SE in hippocampus of mice were not altered 24 hours after SE. However, 14 days after SE there was a decrease in agrin expression, followed by an 71 % increase 60 days after SE. Moreover, the intrahippocampal administration of agrin increased the susceptibility to epileptic seizures in SE animals, but not in control mice. In summary, present data support the hypothesis that DRSSAb antibody and agrin are promising therapeutic strategies in the search for new treatments for epilepsy.

Keywords: Epilepsy. Na⁺, K⁺-ATPase. DRSSAb. Agrin. Hyperexcitability. Excitotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosil trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
EEG	Registro eletroencefalográfico
GABA_a	Ácido gama-aminobutírico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ILAE	<i>International League against Epilepsy</i>
LGI-1	Encefalite anti-glioma inativado-1 rico em leucina
Lrp-4	Proteína-4 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
NKA	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	Estado de mal epiléptico ou <i>status epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 EPILEPSIA	10
3.1.1 Classificação	10
3.1.2 Etiologia	12
3.1.3 Epidemiologia	13
3.1.4 Mecanismos celulares	15
3.1.5 Modelos experimentais	18
3.2 Na ⁺ , K ⁺ -ATPASE	20
3.2.1 Anticorpo DRSSAb na ativação da NKA	23
3.2.2 Regulação inibitória da agrina sobre a NKA	25
3.3 HIPÓTESE.....	28
4 ARTIGO CIENTÍFICO	29
5 MANUSCRITO	37
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	70
ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO	72
ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DE REPRODUÇÃO DO ARTIGO PUBLICADO	73

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma das doenças neurológicas crônicas graves mais comum, afeta aproximadamente 65 milhões de pessoas no mundo sem distinção de nacionalidade, origem étnica, ou condição socioeconômica (DE BOER *et al.*, 2008; MOSHE *et al.*, 2015; RAO e LOWENSTEIN, 2015). Nos países em desenvolvimento, em que as opções de tratamento não estão totalmente disponíveis ou devidamente distribuídas à população, a incidência da epilepsia é elevada quando comparada com os países desenvolvidos (SANDER, 2003; FORSGREN *et al.*, 2005; BANERJEE *et al.*, 2009; LAXER *et al.*, 2014). Nesse sentido, a evolução prognóstica atual demonstra que as crises epiléticas podem ser controladas satisfatoriamente, com os fármacos antiepiléticos disponíveis, em aproximadamente dois terços dos indivíduos com epilepsia, sendo que os demais pacientes (um terço) permanecem refratários ao tratamento farmacológico (KWAN e SANDER, 2004; LAXER *et al.*, 2014). Além disso, é necessário ressaltar as diversas comorbidades envolvidas, como depressão, transtornos de ansiedade e déficits cognitivos, o que muitas vezes dificulta o tratamento (HARDEN, 2002; HERMANN *et al.*, 2008; FITZGERALD, 2014). Sendo assim, ao considerarmos os pacientes fármaco resistentes, os efeitos colaterais das terapias disponíveis, os custos socioeconômicos e a necessidade de elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos, concluímos que a descoberta e o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos é de grande importância.

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) é uma proteína da membrana plasmática, amplamente expressa em células eucarióticas e com um papel fundamental na manutenção da homeostase iônica celular (SKOU e ESMANN, 1992; APERIA, 2012). Alterações na sua atividade afetam diretamente a sinalização celular via neurotransmissores, a atividade neuronal e consequentemente, o comportamento animal (MOSELEY *et al.*, 2007). Sob sua função básica temos o transporte de três íons de Na^+ para o meio extracelular e de dois íon de K^+ para o meio intracelular, usando energia proveniente do ATP, uma vez que o transporte é contra o gradiente (SKOU e ESMANN, 1992; GULLEDGE *et al.*, 2013). E assim, acaba por influenciar indiretamente na regulação de íons como Ca^{2+} , Cl^- e H^+ e substâncias como água e glicose (SKOU e ESMANN, 1992; ROSE *et al.*, 2009).

A NKA é uma importante enzima reguladora da excitabilidade neuronal, e evidências demonstram que uma fina regulação da sua atividade enzimática é requerida para o funcionamento saudável no sistema nervoso central (SNC) (APERIA, 2007a; FUNCK *et al.*, 2015). Uma série de estudos mostram que a redução da sua atividade contribui para a iniciação ou disseminação de crises em camundongos e humanos epiléticos (CLAPCOTE *et al.*, 2009;

POULSEN *et al.*, 2010; HOLM *et al.*, 2016). Além de ser reportado uma diminuição da sua atividade em córtex cerebral de pacientes e em hipocampo de camundongos epiléticos (RAPPORT *et al.*, 1975; FUNCK *et al.*, 2014).

Assim, achados clínicos e experimentais apontam para a NKA como um possível alvo para novos tratamentos da epilepsia. Para isso, é requerido o uso de ferramentas farmacológicas e moleculares que permitam a modulação da atividade da NKA. Com esse propósito, estudos apontaram para uma promissora região da enzima que ao se ligar no anticorpo DRSSAb resulta em um aumento da atividade (XU, 2005; LEE *et al.*, 2009). Promovendo a oportunidade de investigação dos níveis de glutamato, glicose e viabilidade em fatias de animais epiléticos após a restauração da atividade da NKA, além da sua ação em comorbidades associadas.

Por outro lado, nos últimos anos foi descoberta a agrina, uma proteína capaz de interagir fisicamente com a NKA e inibir a sua atividade (HILGENBERG *et al.*, 2006). Estudos demonstram um importante papel da agrina no controle da excitabilidade neuronal, junto a neurotripsina, proteína responsável pela sua clivagem (COHEN *et al.*, 1997; STEPHAN *et al.*, 2008). Estudos a respeito da agrina são controversos na literatura, alguns apontam que a ligação a subunidade α_3 da NKA resulta na despolarização e aumento da excitabilidade neuronal (HILGENBERG *et al.*, 2006); outros que a excitabilidade neuronal é alcançada pela agrina, porém sem ligação a enzima NKA (KHORSHIDI, 2013); e outros ainda demonstram efeitos inibitórios sobre o SNC com ativação dos neurônios GABAérgicos por fosforilação relacionado a dor neuropática (CUI e BAZAN, 2010). O que permite o questionamento de qual seria o papel da agrina na epilepsia e nas crises epiléticas.

Com informações ainda limitadas na literatura a respeito das consequências funcionais da modulação da NKA sobre a epilepsia, esse trabalho é importante para determinar se a manipulação farmacológica da atividade da NKA por meio do anticorpo DRSSAb e da agrina são estratégias farmacológicas eficazes para o tratamento da susceptibilidade a crises epiléticas e epilepsia.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Com base em uma literatura ainda limitada em informações a respeito das consequências funcionais e comportamentais da modulação da NKA na epilepsia, o objetivo desse trabalho é determinar se a manipulação farmacológica da atividade da NKA, por meio do anticorpo DRSSAb e da agrina, seriam estratégias farmacológicas eficazes na epilepsia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos do anticorpo DRSSAb sobre parâmetros neuroquímicos dependentes da NKA (captação de glicose, liberação de glutamato e viabilidade de fatias hipocampais de animais epiléticos).
- Determinar os efeitos da administração intrahipocampal do anticorpo DRSSAb sobre o comportamento de animais epiléticos frente ao campo aberto e o *splash* teste.
- Investigar a expressão da agrina e neurotripsina no hipocampo de camundongos em 1, 14 e 60 dias após o estado de mal epilético.
- Avaliar a efeito da agrina sobre as crises induzidas por PTZ em animais saudáveis e epiléticos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EPILEPSIA

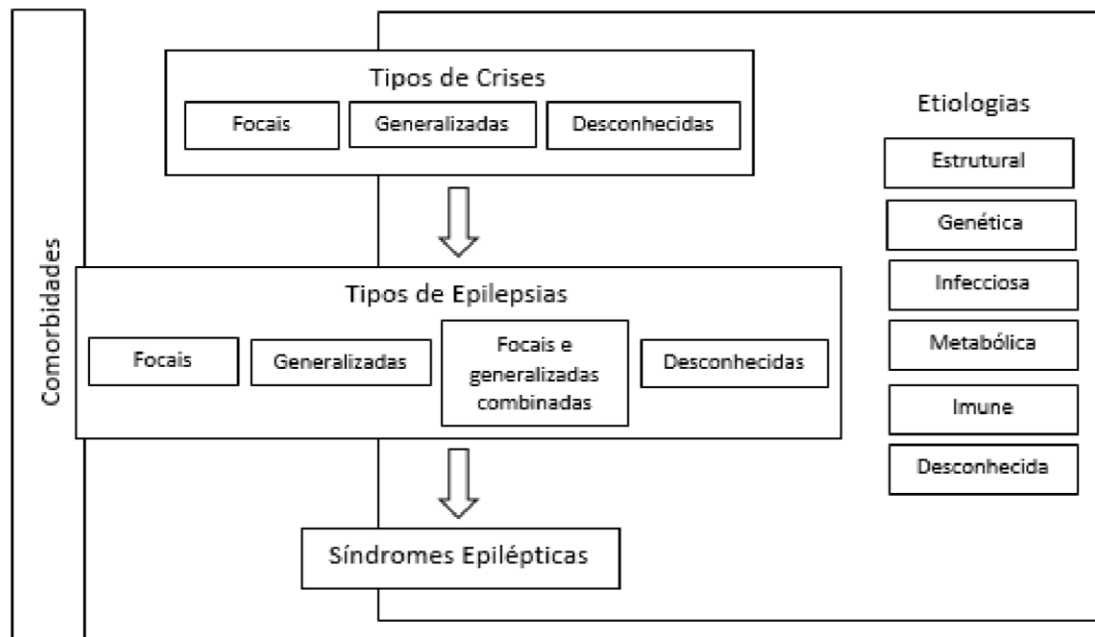
A crise epiléptica é a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas gerados por uma atividade neuronal sincrônica e excessiva no cérebro. A epilepsia é uma doença crônica caracterizada pela predisposição persistente de gerar crises epilépticas, apresentando como consequência alterações neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição. Assim, a crise epiléptica é um evento e a epilepsia é a doença, que envolve crises recorrentes não provocadas (FISHER *et al.*, 2014). Por sua vez, crise convulsiva é a manifestação motora da crise epiléptica (FISHER *et al.*, 2005). A atividade ictal contínua sem recuperação da consciência ou retorno da função neurológica em um tempo superior a trinta minutos caracteriza um episódio de estado de mal epiléptico ou *status epilepticus* (SE) (ROGAWSKI e LOSCHER, 2004; VEZZANI *et al.*, 2011).

A crise epiléptica após uma concussão, febre, ou associada a retirada do álcool exemplifica uma crise provocada, o que não leva a um diagnóstico de epilepsia. O termo “não provocada” implica na ausência de um fator temporário ou reversível que diminui o limiar para crise naquele momento. Não provocada é, no entanto, um termo impreciso, pois nunca podemos ter certeza que não há um fator provocador. As crises reflexas recorrentes, por exemplo em resposta a estímulos fóticos, representam crises provocadas. E nesse caso é definida como epilepsia, uma vez que a tendência de resposta a tais estímulos repetidos gera uma crise e assim satisfaz a definição conceitual da epilepsia, em que há uma predisposição anormal duradoura para se ter as crises. Ainda, a identificação de um fator provocador não necessariamente contradiz a presença de uma anormalidade epileptogênica duradoura. Um limiar de provocação pode desencadear crises em indivíduos com uma predisposição permanente, enquanto em indivíduos não predispostos a crise pode não acontecer (FISHER *et al.*, 2014).

3.1.1 Classificação

A *International League against Epilepsy* (ILAE) publicou uma atual classificação das epilepsias com múltiplos níveis (Figura 1). O objetivo dessa classificação em níveis é assegurar o melhor diagnóstico e quando possível a etiologia da doença em diferentes ambientes clínicos, reconhecendo a variabilidade de recursos disponíveis ao redor do mundo (FISHER *et al.*, 2017).

Figura 1: Esquema diagnóstico para classificação das epilepsias



Fonte: (FISHER *et al.*, 2017).

Presumindo que o clínico já descartou a hipótese de eventos não epiléticos, o reconhecimento do tipo de crise epilética marca o princípio dessa classificação, podendo ser de início focal, generalizado ou desconhecido (FISHER *et al.*, 2017). As crises epiléticas focais conceitualmente originam-se em redes neuronais limitadas à um hemisfério, podendo ser discretamente localizadas ou amplamente distribuídas e originárias de estruturas subcorticais. Já as crises epiléticas generalizadas iniciam em algum ponto de redes distribuídas bilateralmente e rapidamente se alastram, essas redes podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente todo o córtex (BERG *et al.*, 2010).

As crises generalizadas primárias podem ser subdivididas em convulsivas e não convulsivas. Entre as crises convulsivas temos as tônico-clônicas, onde os movimentos são caracterizados pela extensão das extremidades de forma rígida, chamada de fase tônica, seguido das clônias das extremidades, conhecido como fase clônica; essa fase ativa é seguida do período pós-ictal, caracterizado por sonolência, dor de cabeça e dor muscular. A crise generalizada não convulsiva é a crise de ausência típica, caracterizada pela cessão de toda atividade motora, com perda da consciência, porém sem perda da postura (BERG e MILLICHAP, 2013).

Não havendo possibilidade da realização de eletroencefalograma (EEG), vídeo-EEG e imagem ou no caso do paciente apresentar uma única crise ou haver pouca informação, o primeiro nível será o estágio máximo da classificação diagnóstica (FISHER *et al.*, 2017).

No próximo passo é definido o tipo de epilepsia, quando assume-se que o paciente tem o diagnóstico da doença, em que as crises epiléticas são recorrentes e não provocadas. Nesse patamar os tipos de epilepsia podem ser focais, generalizadas, focais e generalizadas combinadas ou desconhecidas, sendo o diagnóstico feito pela combinação de EEG e dados clínicos (FISHER *et al.*, 2017). Conceitualmente, considera-se epilepsia casos nos quais ocorre pelo menos uma crise não provocada com alto risco para outra (FISHER *et al.*, 2014). Isso porque, após a primeira crise não provocada, o risco para outra é de 40-52% (BERG e SHINNAR, 1991). Na ocorrência de duas crises não provocadas e não febril a chance para se ter outra em um intervalo de 4 anos aumenta para 73% (HAUSER *et al.*, 1998).

O terceiro nível é o diagnóstico de uma síndrome epilética que é definida como um distúrbio epilético caracterizado pela presença de sinais e sintomas complexos que definem uma condição epilética única (ENGEL, 2001). A fim de orientar o manejo clínico a síndrome refere-se a um conjunto de características tidas pelos tipos de crises, EEG e características de imagem, bem como bases clínicas (como história, idade de início, tipos e modo de aparecimento das crises, natureza progressiva ou não, achados neurológicos e neuropsicológicos). (FISHER *et al.*, 2017).

A definição para epilepsia propõe fornecer apoio médico a decisão de iniciar o tratamento de um paciente com alto risco de recorrência após uma única crise não provocada. No entanto, a decisão de tratamento deve ser individualizada dependendo dos desejos do paciente e a razão risco-benefício. O clínico deve ponderar a possibilidade de evitar uma segunda crise com os riscos associados, contra os efeitos secundários relacionados com o fármaco e o custo para os pacientes (FISHER *et al.*, 2014).

3.1.2 Etiologia

Do ponto de vista etiológico, a epilepsia pode ser dividida em cinco categorias, com ênfase naquelas que apresentam implicações terapêuticas. Etiologia estrutural: são anormalidades visíveis em estudos de neuroimagem que em conjunto com a avaliação eletroclínica determina que essa anormalidade estrutural acarreta um risco aumentado de estar associado com a epilepsia, podendo ser de causas adquiridas como acidente vascular cerebral

(AVC), trauma e infecção, ou genéticas com várias malformações do desenvolvimento cortical (FISHER *et al.*, 2017).

Etiologia genética: é o resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida na qual as crises epiléticas constituem o sintoma central da doença (por exemplo, mutações em genes do canal de potássio), ressalta-se que a causa genética não quer dizer hereditária, podendo ser uma nova mutação que surgiu naquele indivíduo, e assim sendo improvável que haja histórico familiar de crises (FISHER *et al.*, 2017).

Etiologia infecciosa: é a mais comum em todo o mundo, onde as crises epiléticas são os sintomas centrais da afecção, esse contexto implica no desenvolvimento da epilepsia e não somente as crises na infecção aguda, podendo ter um correlato estrutural. São exemplos de etiologia infecciosa na epilepsia a neurocisticercose, tuberculose, vírus da imunodeficiência humana (HIV), malária cerebral, panencefalite esclerosante subaguda (ou encefalite do sarampo), toxoplasmose cerebral, e infecções congênitas como pelo Zika vírus e citomegalovírus (FISHER *et al.*, 2017).

Etiologia metabólica: distúrbios metabólicos bem delineados com manifestações ou alterações bioquímicas que resultam diretamente em crises epiléticas, em muitos casos terão um defeito genético, mas algumas podem ser adquiridas, como a deficiência cerebral de folato; outros exemplos são porfiria, uremia, aminoacidopatias ou crises por dependência de piridoxina (FISHER *et al.*, 2017).

Etiologia imune: quando as evidências apontam para uma inflamação imune-mediada no sistema nervoso central (SNC) como causa das crises, por exemplo, a encefalite anti-receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e a encefalite anti-glioma inativado-1 rico em leucina (LGI-1) (FISHER *et al.*, 2017).

Etiologia desconhecida: em que não há evidencia clara de um fator etiológico, não sendo possível fazer um diagnóstico específico. O grau de definição da etiologia vai depender do tipo de avaliação disponível, diferindo conforme a instituição de saúde e do país. Com essa nova classificação espera-se melhorias no diagnóstico, compreensão das etiologias e direcionamento terapêutico por parte da comunidade epileptológica. Essas definições com termos padronizados são de grande importância como ferramenta de comunicação na prática clínica e na pesquisa (FISHER *et al.*, 2017).

3.1.3 Epidemiologia

Aproximadamente 65 milhões de pessoas em todo o mundo tem epilepsia (MOSHE *et al.*, 2015). Um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2006 mostrou que cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo sofrem com doenças neurológicas. Dentre essas, a epilepsia aparece entre as de maior morbimortalidade (WHO, 2006). Nesse contexto, é importante salientar que em 2005 o Ministério da Saúde do Brasil lançou uma portaria reconhecendo a importância epidemiológica e a magnitude social das doenças neurológicas no Brasil, incluindo a epilepsia. Também são ressaltados, nessa resolução, o custo elevado e crescente para o país, o quadro de morbidade com alto grau de sequelas de doenças neurológicas e a elevada taxa de mortalidade (BRASIL, 2005). Embora existam poucos estudos sobre a epidemiologia da epilepsia no Brasil, baseado em estudos internacionais pode-se inferir que o país apresenta aproximadamente 340 mil novos casos ao ano (GALLUCCI NETO e MARCHETTI, 2005).

Embora seja uma doença global, perto de 80% dos casos encontram-se em países com recursos limitados, isso se deve principalmente as elevadas taxas de infecções no sistema nervoso central (SNC), como malária cerebral, tuberculose, esquistossomose, HIV e neurocisticercose (MOSHE *et al.*, 2015). A epilepsia é considerada uma condição tratável pois cerca de 70% dos pacientes tem as crises controladas por drogas anticonvulsivantes. Apesar disso, 73,3% dos pacientes de áreas rurais de países com baixo desenvolvimento não recebem tratamento ou receberam um tratamento inadequado. Isso forma uma “lacuna de tratamentos” (do inglês, *treatment gap*), que está associada a baixa qualidade de vida, estigma social e discriminação no trabalho. Além disso, nessa lacuna de tratamentos temos altas taxas de mortalidade, onde em alguns lugares da África chegam ser 6 vezes maiores que em países desenvolvidos (MBUBA *et al.*, 2008; NGUGI *et al.*, 2014). Dentre outras circunstâncias vale destacar que o alto custo para o tratamento efetivo é o que faz perpetuar essa lacuna terapêutica e aumentar o impacto da doença.

Através de um indicador (*DALYs – diseases measured in disability adjusted life years*) composto pela medida de anos de vida perdidos por mortalidade prematura e anos de vida com uma doença incapacitante, foi possível aferir que de todas as doenças ao redor do mundo a epilepsia representa cerca de 0,7% desse fardo. Em um ranqueamento desse indicador a epilepsia fica em 36º lugar globalmente, e em alguns lugares como na América-Latina e África subsaariana em 21º e 14º lugar nesse mesmo ranque, respectivamente (MURRAY *et al.*, 2012).

Estudos em regiões pobres do mundo mostram que 51% dos pacientes com epilepsia ativa são crianças, 69% iniciaram as crises na adolescência, em 25% ocorreu o SE e somente 36% receberam tratamento com fármacos antiepilépticos. As principais comorbidades

relacionadas foram a desnutrição, prejuízo cognitivo e déficit neurológico. O perfil sócio demográfico dos pacientes com epilepsia apontam para características de baixo nível educacional, desemprego e pessoa solteira. Características essas não exclusivas de países subdesenvolvidos, já que esses resultados são encontrados também em alguns países europeus. Esse delineamento se correlaciona diretamente com a forte estigmatização da doença, onde a condição social e econômica vulnerável promove limitação nas oportunidades de educação, emprego e casamento (WILMSHURST *et al.*, 2014).

A epilepsia foi colocada pela primeira vez na agenda da OMS, em janeiro de 2015, como doença prioritária necessitando de uma ação coordenada a nível de cada país, dirigida aos seus aspectos médicos, sociais e de conhecimento público. No documento redigido é feita uma série de observações de grande relevância referentes à doença, entre elas a necessidade de orientações específicas sobre a epilepsia à população, para que não haja estigmatização e discriminação devido a ignorância e mal-entendidos. Além da necessidade de atribuição de recursos financeiros; execução de planos de cuidados à saúde assistenciais, com recursos humanos treinados; formação de conhecimentos básicos em assistência à epilepsia que possibilite o diagnóstico e tratamento; melhora da acessibilidade e barateamento de medicamentos antiepilépticos seguros, eficazes e de qualidade; aumento de investimento e a capacidade de investigação em epilepsia (OMS, 2015).

3.1.4 Mecanismos celulares

Na era moderna dos medicamentos anticonvulsivantes, abrangendo um período de 150 anos após a primeira utilização de brometos até os dias de hoje, tem sido introduzido na prática clínica um diversificado grupo de medicamentos, os quais proporcionam benefícios imensuráveis para os pacientes que sofrem com crises epiléticas de todos os tipos (ROGAWSKI e LOSCHER, 2004). Nenhum dos novos fármacos anticonvulsivantes, incluindo os que atuam em alvos recentemente identificados, podem ser considerados uma “bala mágica” que cura o paciente de forma confiável das crises, mas se tem tido melhoras consideráveis na segurança, tolerabilidade e farmacocinética (BIALER e WHITE, 2010). Assim, as pessoas com epilepsia responsivas à terapia com antiepilépticos conseguem ter uma qualidade de vida muitas vezes semelhante à população em geral (ROGAWSKI, 2013).

Entretanto, é estimado que entre 30% a 40% dos pacientes não respondem as terapias com fármacos anticonvulsivantes e continuam apresentando crises refratárias (LAXER *et al.*, 2014). Em pacientes classificados como fármaco-resistentes o diagnóstico implica em

prognósticos pobres que incluem: aumento do risco de morte súbita, lesões físicas, disfunções psicossociais e redução na qualidade de vida (TELLEZ-ZENTENO *et al.*, 2014).

Também é preciso ressaltar que pacientes com epilepsia podem ser afetados negativamente por diversas comorbidades neurológicas de difícil tratamento, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e déficits cognitivos. Historicamente, a origem dessas comorbidades têm sido atribuídas por exemplo, à consciência do paciente de sua condição crônica, à presença de neuropatologia primária (como esclerose do lobo temporal) ou consideradas efeitos adversos indissociáveis dos fármacos anticonvulsivantes (HERMANN *et al.*, 2008). Estudos demonstram que a resposta a fármacos anticonvulsivantes é menor em pacientes epiléticos com depressão, e que o tratamento da depressão associada à epilepsia é um fator chave para melhora da qualidade de vida desses indivíduos (HARDEN, 2002; KRISHNAMOORTHY, 2003; FITZGERALD, 2014). Além disso, diversos estudos têm mostrado que alterações neuroquímicas e estruturais podem contribuir de maneira crucial para o aparecimento dessas comorbidades (GALLUCCI NETO e MARCHETTI, 2005; HERMANN *et al.*, 2008).

O mecanismo que envolve a crise epilética está associado com o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória, podendo ser resultado de alterações na expressão de vários neurotransmissores excitatórios, inibitórios e/ou neuromoduladores (CREMER *et al.*, 2009). Considerando os mecanismos moleculares, estudos indicam que o metabolismo energético está comprometido na epilepsia. Há um déficit bioenergético nas áreas epiléticas com hiperfunção e redução na captação de glicose, especialmente na epilepsia do lobo temporal (SADZOT *et al.*, 1992; LAMUSUO *et al.*, 2001). Além de um lento ciclo glutamato-glutamina, que ao atrasar a depuração do glutamato, aumenta seus níveis extracelular contribuindo para a geração de crises epiléticas (PETROFF *et al.*, 2002).

Cavus e colaboradores (2005) em um estudo que mensurou metabólitos extracelulares no córtex e hipocampo de pacientes epiléticos propôs que a deficiência energética interictal no hipocampo epileptogênico está associado à diminuição da captação de glutamato e baixa razão glutamina/glutamato, resultando em um aumento persistente do glutamato extracelular causando toxicidade glial e neuronal. Bem como uma má utilização do fornecimento de energia disponível, pelos altos níveis de lactato e indicação de baixo uso da glicose, o que reforça a piora do metabolismo energético. Enquanto, no córtex houve apenas um aumento marginal nos níveis de glutamato.

Por atuar como um importante neurotransmissor excitatório a dinâmica de equilíbrio que define a concentração de glutamato extracelular é fundamental para sobrevivência e função

normal dos neurônios (ANDERSON e SWANSON, 2000). Devido a inexistência de uma enzima de degradação, pouca ou nenhuma conversão bioquímica do glutamato é feita no espaço extracelular, sendo necessária a interação com transportadores para sua remoção da fenda sináptica. A expressão reduzida ou o funcionamento deficiente dos transportadores de glutamato parece estar associado ou ser a causa para as crises epiléticas. Ainda, deve-se considerar que para um eficiente mecanismo de remoção sináptica por absorção celular, a concentração de glutamato extra sináptica deve estar baixa. Em caso de extravasamento celular de glutamato o processo de remoção acaba sendo muito lento ao redor das sinapses, devido a espessura do tecido (dezenas de milímetros em humanos) (DANBOLT, 2001; VARGASSANCHEZ *et al.*, 2018).

Apesar de durante a crise epilética haver um maior metabolismo da glicose e consequentemente o aumento nos níveis de lactato devido a atividade neuronal sincrônica (FAUSER e TUMANI, 2018), sob a condição crônica, especialmente na epilepsia do lobo temporal, o hipometabolismo da glicose é comum no hipocampo de pacientes (ZHANG *et al.*, 2015). Estudos tem demonstrado que o hipometabolismo pode estar associado com a degeneração tecidual e morte celular nessas regiões (CHEN e BUCKMASTER, 2005; SHARMA *et al.*, 2008), inclusive auxiliando na identificação de regiões cerebrais envolvidas no início da crise (GUO *et al.*, 2009). Em um estudo de mapeamento da utilização da glicose em cérebros de ratos durante a epileptogênese, causada pela administração de pilocarpina sistêmica, observa-se uma diminuição na utilização da glicose na maioria das estruturas cerebrais nas fases inicial (2 dias após o SE) e latente (7 dias após o SE) da epilepsia, especialmente nas estruturas límbicas e no tálamo. Já o hipometabolismo da glicose na fase crônica (42 dias após o SE) persiste no hipocampo e tálamo desses animais (GUO *et al.*, 2009). Em outro estudo realizado em ratos houve uma correlação entre o hipometabolismo hipocampal da glicose e mudanças histológicas após o tratamento sistêmico com pilocarpina. A fase latente (7 dias após SE) é marcada por uma diminuição significativa de glicose correlacionada a uma diminuição de células neuronais, já uma recuperação parcial nos níveis de captação de glicose é vista no período crônico (60 dias após SE) juntamente a uma astrogliose (ZHANG *et al.*, 2015).

Sendo assim, ao levarmos em consideração os pacientes epiléticos fármaco-resistentes, os efeitos adversos das terapias disponíveis, as comorbidades junto a epilepsia, o estigma em que a doença ainda está envolta, os custos socioeconômicos para a saúde pública e a utilidade de melhor elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem a doença, concluímos que há grande necessidade do contínuo desenvolvimento das pesquisas em epilepsia. Para isto, devemos considerar que a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes, quiçá

antiepiléticos, baseia-se fortemente no uso pré-clínico de modelos em animais, os quais oferecem uma crucial resposta de eficácia e segurança para drogas em estudo, antes de serem realizados os ensaios em humanos (LOSCHER, 2011). Os modelos animais frente ao estudo de novos tratamentos anticonvulsivantes servem para a identificação de novas substâncias, caracterização do espectro de ação, teste da eficácia em tratamentos crônicos e alterações farmacológicas decorrentes, avaliação dos níveis farmacológicos e/ou toxicológicos no organismo (FUNCHAL e DANI, 2014).

3.1.5 Modelos experimentais de crises epiléticas e epilepsia

As crises espontâneas e recorrentes podem ser geradas em roedores pelo uso da pilocarpina, um modelo químico mimético da epilepsia do lobo temporal de humanos (LEITE *et al.*, 2002). Esse modelo é caracterizado por uma lesão precipitante que atinge o hipocampo e/ou o lobo temporal (causada por exemplo pelo SE), um período latente entre a lesão e a ocorrência das crises convulsivas espontâneas, a manifestação crônica de crises espontâneas (geralmente convulsões tônico-clônicas) e alterações histopatológicas peculiares da epilepsia do lobo temporal (LOTHMAN e BERTRAM, 1993; MATHERN *et al.*, 2002).

A pilocarpina é um agonista de receptor colinérgico muscarínico, que quando injetado de forma sistêmica causa crises convulsivas que acumulam-se resultando no SE (TURSKI *et al.*, 1983; FURTADO MDE *et al.*, 2002). O SE é uma condição resultante da falha dos mecanismos responsáveis por cessar a crise convulsiva ou do início desse mecanismos em si, gerando uma crise convulsiva anormalmente prolongada, que pode ter consequências a longo prazo, como morte celular, lesão neuronal e alterações das redes neuronais (TRINKA *et al.*, 2015). Os mecanismos envolvidos na esclerose hipocampal podem ser diferentes dos mecanismos envolvidos na geração das crises, uma vez que a morte celular é vista após o SE, e não necessariamente após crises recorrentes (BUCKMASTER e LEW, 2011).

Danos estruturais e consequentemente o desenvolvimento das crises espontâneas e recorrentes assemelham-se as crises parciais complexas de humanos (CAVALHEIRO *et al.*, 1991). Além disso, existem diversas outras semelhanças neuroquímicas, como reorganização das redes neuronais na região hipocampal, com brotamento de fibras musgosas, perda interneural e proliferação ectópica de células do giro denteado (WIESER, 2004), atividade interictal que pode ser gerada pelo subículo (WOZNY *et al.*, 2003; KNOPP *et al.*, 2005), neurotrofinas reguladas positivamente no hipocampo (MUDO *et al.*, 1996; KANDRATAVICIUS, MONTEIRO, ASSIRATI, *et al.*, 2013). Devemos citar também que esse modelo químico, assim como a

epilepsia do lobo temporal em humanos, causa déficits cognitivos e na memória (LEITE *et al.*, 1990; PAULI *et al.*, 2006; KANDRATAVICIUS, MONTEIRO, HALLAK, *et al.*, 2013; FAURE *et al.*, 2014).

Sendo assim, o modelo animal induzido pela pilocarpina permite o estudo de fármacos antiepilépticos com diferentes propósitos. Na fase aguda é possível identificar compostos com eficácia sobre o SE e/ou neuroproteção contra os danos induzidos pelas crises sustentadas. No período latente, é possível identificar agentes com potencial na prevenção da epileptogênese e/ou contra os déficits comportamentais de longo prazo induzidos pelas crises. E finalmente na fase crônica é possível testar compostos efetivos contra as crises espontâneas recorrentes (LEITE *et al.*, 2002).

Outro convulsivante químico é o pentilenotetrazol (PTZ), este por sua vez é responsável por produzir crises tônico-clônicas agudas em roedores. O PTZ gera um modelo capaz de testar a capacidade de um composto, em um pré-tratamento, de aumentar o limiar para as crises e/ou proteger o animal de uma crise tônico-clônica, durante um período de observação de trinta minutos (YUEN e TROCONIZ, 2015). Tido como um modelo “padrão ouro”, é um dos primeiros a ser utilizado para triagem na detecção de drogas com atividade anticonvulsivante (SMITH *et al.*, 2007; ROGAWSKI e BAZIL, 2008).

O PTZ por ser um modelo capaz de gerar crises convulsivas agudas permite o rastreamento de um grande número de compostos, sendo de fácil realização, tempo e custo eficientes e com alto poder preditivo clínico (LOSCHER, 2011). Trata-se de um antagonista não-competitivo do receptor ácido gama-aminobutírico (GABA_A), um receptor acoplado a um canal permeável a cloreto, cuja ativação provoca hiperpolarização localizada na membrana neuronal que torna o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (LOSCHER, 1998). Fármacos utilizados na clínica como ácido valproico, fenobarbital, benzodiazepínicos, gabapentina e vigabatrina demonstraram eficácia preditiva frente ao modelo do PTZ (BIALER e WHITE, 2010).

Em um estudo de mapeamento das redes neuronais atingidas pelo PTZ em ratos, mesmo em baixas doses, onde não foram vistas mudanças comportamentais e no EEG, a imunoreatividade por c-Fos é positiva na amígdala, núcleo paraventricular hipotalâmico, região CA3 hipocampal, córtex parietal e no complexo olivar superior em ratos adultos. Já em doses altas, em que o PTZ gera crises tônico-clônicas, a expressão de c-Fos é alta no córtex cerebral, algumas áreas do prosencéfalo, tálamo, hipotálamo e na camada granular e giro denteado do hipocampo (ANDRE *et al.*, 1998).

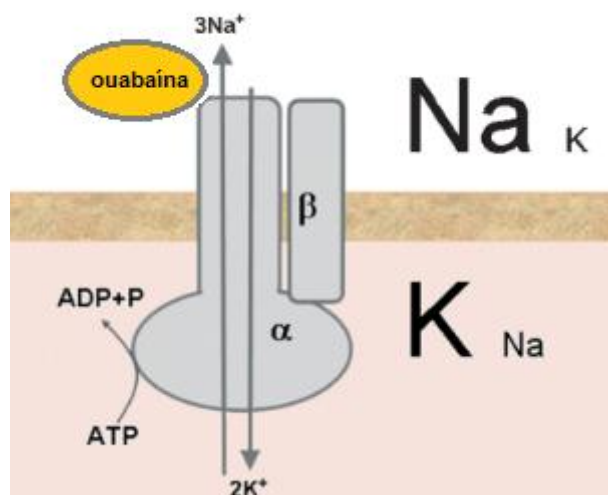
Da mesma forma que a descoberta de novos fármacos antiepilépticos a identificação dos alvos farmacológicos é de grande importância, uma vez que os mecanismos subjacentes da

epilepsia não são entendidos na sua plenitude. Considerando que a proteína Na^+ , K^+ -ATPase é importante na regulação da excitabilidade neuronal e os estudos que evidenciam seu papel na epilepsia, a sua manipulação farmacológica parece ser interessante sob luz do conhecimento de novas estratégias terapêuticas.

3.2 Na^+ , K^+ -ATPase

A bomba de Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) é conhecida pelo seu papel no transporte iônico através da membrana plasmática nas células animais. Três íons de sódio são carregados para fora, enquanto dois íons de potássio são conduzidos para o interior celular usando a energia da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), mantendo assim o equilíbrio de eletrólitos e fluidos (APERIA, 2007a; REINHARD et al., 2013) (Figura 2). A NKA é uma proteína membro da superfamília ATPase do tipo P, também está envolvida na transdução de sinal e modulação do crescimento, apoptose, adesão celular e motilidade, além de influenciar no transporte secundário de moléculas como glicose, neurotransmissores, aminoácidos, água e outros íons como H^+ , Ca^{2+} , Cl^- (CLAUSEN et al., 2017).

Figura 2: Funcionamento da enzima NKA. A NKA acoplada a hidrólise de ATP faz o transporte ativo de 3 íons de Na^+ para fora da célula em troca de 2 íons de K^+ durante cada ciclo enzimático. A ouabaína ao se ligar a enzima inibe sua atividade.



Fonte: (APERIA, 2007a).

O complexo proteico da NKA possui três subunidades, a subunidade alfa (α), beta (β) e FXYD, também chamada gama (γ). Existem quatro isoformas da subunidade α , três da β e sete da subunidade FXYD (CLAUSEN *et al.*, 2017). A subunidade α da NKA é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos, tem um peso molecular próximo de 110 kDa, e uma estrutura tridimensional com 10 domínios transmembrana, além de conter os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP, glicosídeos cardiotônicos e inibidores específicos da enzima (KAPLAN, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2003). As diferenças na sequência de aminoácidos entre as subunidades α são mínimas, mas acabam por resultar em diferenças cruciais principalmente em relação a sensibilidade a inibidores, como a ouabaína. Enquanto as isoformas α_2 ou α_3 possuem um IC50 para ouabaína de 28,4 ηM , as isoformas contendo subunidades α_1 possuem um IC50 de 89,4 μM para o mesmo inibidor (NISHI *et al.*, 1999). A subunidade β da NKA é composta de aproximadamente 370 aminoácidos e tem um peso molecular próximo de 55 kDa, com apenas um domínio transmembrana, onde a porção amino terminal está exposta no citosol (KAPLAN, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2003). Por fim a subunidade γ é composta por 58 aminoácidos e tem um peso molecular próximo à 6,5 kDa (THERIEN e BLOSTEIN, 2000).

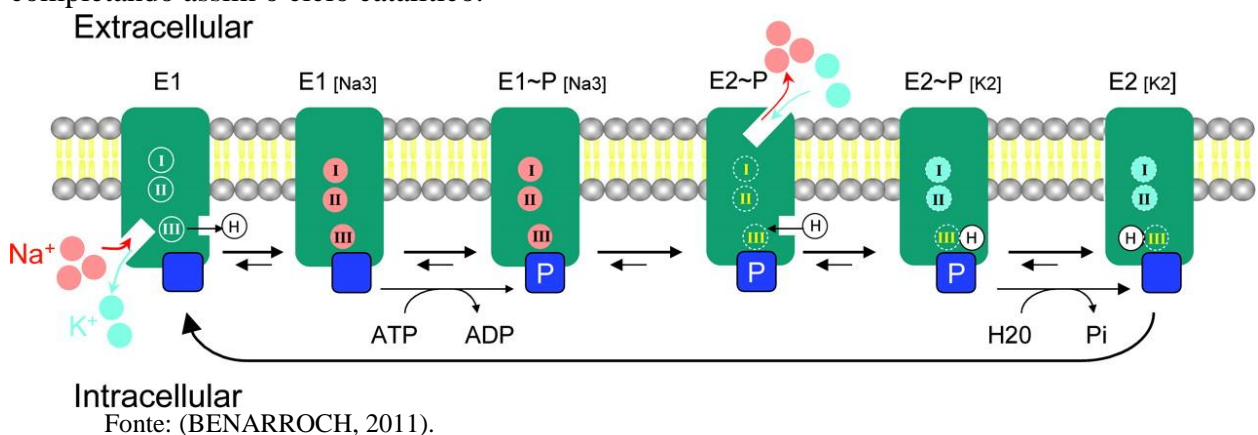
A função da NKA depende mais fortemente das partes internas, enquanto diferenças na superfície permitem que as isoformas tenham suas próprias redes de interação (CLAUSEN *et al.*, 2017). Além disso, as diferentes combinações entre as isoformas das subunidades α e β formam uma variedade de composições para NKA, e são diferentemente expressas em células de tecidos específicos com características funcionais otimizadas (KAPLAN, 2002). Estudos de purificação enzimática demonstraram que as subunidades α e β são ambas essenciais para a atividade enzimática da NKA. A subunidade β tem papel na estabilização da subunidade α , facilitando as propriedades funcionais de afinidade por cátions; além disso, na ausência da porção β parece improvável que a subunidade α tenha atividade ATPásica (KAPLAN, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2003).

Estudos sobre a função da subunidade γ são controversos. Enquanto alguns trabalhos que fazem a sua dissociação do dímero $\alpha\beta$, utilizando detergente não iônico, demonstraram que não houve alteração na atividade da bomba NKA, nem na sua afinidade por ouabaína ou na expressão funcional da enzima, demonstrando que a subunidade γ não seria um componente essencial (HARDWICKE e FREYTAG, 1981; DETOMASO *et al.*, 1993; THERIEN e BLOSTEIN, 2000). Outros estudos trazem que a redução da subunidade γ por técnica de RNA antisense altera a afinidade da enzima NKA por ouabaína, Na^+ , K^+ e ATP (BEGUIN *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997; THERIEN e BLOSTEIN, 2000).

Esquemáticamente, a bomba está na forma E1 quando tem alta afinidade pelo Na^+ , e na forma E2 quando tem alta afinidade pelo K^+ . A transição de E1 para E2 é acoplada à liberação de adenosina difosfato (ADP), com abertura da porta externa e liberação dos 3 íons de sódio para o meio extracelular. O potássio pode então se ligar a partir do lado extracelular, então a porta externa se fecha para ocluir os dois íons de potássio e o aspartato do domínio P é desfosforilado. A liberação citoplasmática dos íons de potássio e do próton (compensador da carga negativa do local de ligação único para sódio), a ligação do ATP e a transição de volta a forma E1 fazem a bomba estar pronta para outro ciclo (POULSEN *et al.*, 2010) (Figura 3).

Em humanos o funcionamento da NKA é responsável por 30% do consumo total da energia (APERIA, 2007a). No cérebro há uma demanda massiva da atividade dessa enzima para reverter o fluxo pós-sináptico de sódio, reestabelecer os gradientes de sódio e potássio usados para o disparo de potenciais de ação, e em astrócitos auxilia na captação de neurotransmissores. Na massa cinzenta estima-se que apenas um quarto da energia é usada para manutenção da funções normais, como síntese de proteínas e outras moléculas, enquanto o restante é consumido pela NKA (ATTWELL e LAUGHLIN, 2001; CLAUSEN *et al.*, 2017).

Figura 3: Esquema representativo do funcionamento da enzima NKA. A ligação de 3 íons de Na^+ do lado citoplasmático (E1) ativam sua fosforilação produzindo um intermediário de alta energia (E1P). A mudança conformacional de E1P para o estado E2P leva à expulsão ativa dos íons de Na^+ e a ligação de 2 íons de K^+ no revestimento externo da enzima. A ligação dos íons de K^+ desencadeia a desfosforilação enzimática para recuperar o seu estado E1 ativo, completando assim o ciclo catalítico.



Nos neurônios a NKA pode consumir até 70 % da energia celular e o seu papel é crucial nas exigências metabólicas básicas, em especial na função de transmissão do impulso nervoso, além de atividades associadas, como o estabelecimento do potencial da membrana em repouso, a recaptação de neurotransmissores e o efluxo de cálcio (BLANCO e MERCER, 1998; HABIBA *et al.*, 2000). Células neuronais podem expressar uma única ou múltiplas isoenzimas resultante

da associação de diferentes heterodímeros entre subunidades α e β da NKA (HABIBA *et al.*, 2000). A isoforma α_1 é expressa de forma onipresente no tecido nervoso, enquanto a isoforma α_3 é encontrada exclusivamente nos neurônios e a α_2 é a isoforma característica das células gliais e geralmente não é expressa nos neurônios (MCGRAIL *et al.*, 1991; CAMERON *et al.*, 1994). Já a subunidade β_1 é expressa em neurônios, enquanto a subunidade β_2 é expressa predominantemente na glia e a β_3 parece estar presente em neurônios e glia (MALIK *et al.*, 1998).

Como os gradientes iônicos são de vital importância para todos os tecidos, a perturbação na atividade da NKA está envolvida em diversas condições fisiopatológicas, como câncer (DURLACHER *et al.*, 2015), diabetes (VAGUE *et al.*, 2004), insuficiência cardíaca (SCHWINGER *et al.*, 2003) e, em desordens neurológicas, como a epilepsia (JURKAT-ROTT *et al.*, 2004; POULSEN *et al.*, 2010).

A NKA é um grande regulador da excitabilidade no cérebro (APERIA, 2007a). Há inúmeras evidências apoiando a relação entre a diminuição da atividade da NKA e a hiperexcitabilidade cerebral (HAGLUND e SCHWARTZKROIN, 1990; CLAPCOTE *et al.*, 2009). Um estudo do nosso grupo demonstra que a atividade da NKA correlaciona-se positivamente com a latência para crises clônicas e generalizadas induzidas por PTZ (MARQUEZAN *et al.*, 2013). Subsequentemente, é vista uma diminuição da atividade da NKA no hipocampo de camundongos 60 dias após o SE, e esta redução parece estar associada com o aumento da nitração da subunidade α (FUNCK *et al.*, 2014). Interessantemente, a administração intrahipocampal do anticorpo DRSSAb, responsável por aumentar o transporte ativo da enzima NKA, diminuiu a susceptibilidade para crises mioclônicas induzidas por PTZ em animais epiléticos, enquanto que em animais saudáveis o mesmo anticorpo facilita o aparecimento de crises induzidas por PTZ (FUNCK *et al.*, 2015).

Sendo assim, recentes avanços na compreensão dos mecanismos de regulação da atividade da NKA tem levado ao desenvolvimento de ferramentas farmacológicas e moleculares eficazes em aumentar ou prevenir a diminuição da atividade da enzima, provendo a oportunidade para testar a hipótese que a restauração da atividade da NKA seria um mecanismo de ação com grande potencial para o tratamento de doenças neurológicas, incluindo a epilepsia e comorbidades associadas.

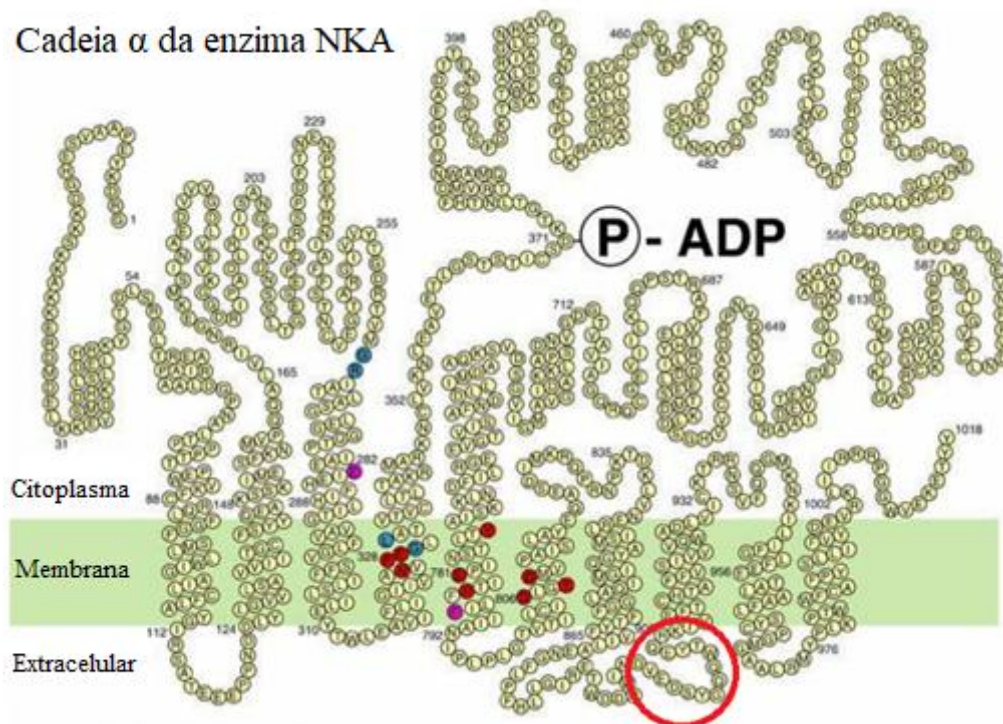
3.2.1 Anticorpo DRSSAb na ativação da NKA

Moduladores da NKA como glicosídeos cardiotônicos são usados na prática clínica para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e alguns tipos específicos de arritmias. Porém, a ação inibidora sobre a NKA limita o seu uso em condições onde a enzima encontra-se com atividade diminuída, como é o caso de muitas condições neurológicas (APERIA, 2007a; BENARROCH, 2011). Evidências apontam para uma diminuição na atividade da NKA em córtex cerebral de pacientes epiléticos e no hipocampo de camundongos em modelo de epilepsia induzido por pilocarpina (RAPPORT *et al.*, 1975; FUNCK *et al.*, 2014).

Em busca de novas ferramentas farmacológicas e moleculares que visam o aumento ou prevenção da diminuição da atividade da NKA, chegou-se ao anticorpo DRSSAb. Produzido pelo Dr. James W. Larrick e sua equipe no instituto de Pesquisa Panorama (Panorama Research), localizado em Sunnyvale nos EUA, na região do Vale do Silício.

Através da identificação de um sítio de ativação da enzima NKA entre os aminoácidos 897 a 911 presentes na região D-R que reside no interior do domínio extracelular entre H7-H8 da subunidade α da NKA. Demonstrou-se que a região $^{897}\text{DVEDSYGQQWTYEQR}^{911}$ é um importante local de ativação da NKA, e a interação de anticorpo-antígeno é capaz de promover uma função catalítica da enzima ainda mais acelerada (XU, 2005) (Figura 4).

Figura 4: Local de ligação do anticorpo DRSSAb à região α da enzima NKA (região circulada).



Fonte: (XU, 2005).

A comparação do sequenciamento de aminoácidos na região D-R é altamente conservada, na isoforma α_1 é idêntica em diferentes espécies, a semelhança é de 87% entre α_1 e α_2 e de 93% em comparação a isoforma α_3 , demonstrando que essa região pode ser um sítio de ativação universal, já que o anticorpo foi produzido para interagir com essa sequência de aminoácidos. Além disso, através da técnica de imunoprecipitação e Western blotting foi visto alta especificação na ligação do DRSSAb ao sítio da NKA. E por microscopia imunofluorescente e o uso de ouabaína marcada foi possível demonstrar que a região D-R não é um sítio de interação entre a ouabaína e a enzima NKA, uma vez que o anticorpo DRSSAb não competiu pelos sítios de ligação, nem preveniu a inativação da enzima (XU, 2005).

Incubações com vesículas cardíacas isoladas do coração de ratos demonstraram um aumento da atividade da NKA com aumento das contrações celulares dos miócitos, revelando que a ativação da NKA gera um efeito inotrópico positivo *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que os aminoácidos da região de ligação do anticorpo podem ser vitais para a atividade da enzima (XU, 2005; XU *et al.*, 2006).

É provável que a ligação de DRSSAb à região D-R da enzima possa produzir mudanças radicais na estrutura da NKA e simultaneamente diminuir a energia livre para muitas interações não covalentes envolvidas nas transições conformacionais e, assim, uma diminuição na energia de ativação da reação, além do aumento da afinidade por Mg^{2+}/ATP . Resultando em um aumento na taxa de reação, que em última análise, pode levar a modificações da atividade biológica da enzima (XU, 2005).

Em outro estudo em cardiomiócitos isolados, a ativação da NKA pelo anticorpo DRSSAb pode produzir efeitos inotrópicos positivos e cardioprotetores ativando a via das quinases reguladas por sinais extracelulares. Salientando a importância clínica desse anticorpo, já que as drogas disponíveis para o tratamento de insuficiência cardíaca mostram potenciais cardiotoxicos (ZHENG *et al.*, 2011).

Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, é demonstrado que na incubação de homogeneizado hipocampal com DRSSAb em baixa concentração (1 μM) há um aumento da atividade total e da subunidade α_1 da enzima NKA, aumentando a concentração do anticorpo (3 μM) o aumento da atividade da enzima é total, na isoforma α_1 e também na isoforma α_2/α_3 . Além disso, experimentos *in vivo* onde é administrado DRSSAb no hipocampo de camundongos observa-se uma diminuição a susceptibilidade a crise induzida por PTZ em animais epiléticos (60 dias após SE induzido por pilocarpina), em contrapartida a administração do mesmo anticorpo no hipocampo de animais saudáveis facilita as crises induzidas por PTZ, demonstrando

uma tênue regulação da enzima e que sua desregulação para qualquer direção passa a ser prejudicial, contribuindo para o início das crises epiléticas (FUNCK *et al.*, 2015).

3.2.2 Regulação inibitória da agrina sobre a NKA

No SNC a diminuição da atividade da NKA afeta diretamente a sinalização celular. A ouabaína é um esteroide cardiotônico extraído de plantas digitálicas com ação inibidora sobre a NKA (WHAYNE, 2018). Estudos demonstram que a ouabaína aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de porquinhos-da-índia (FUJISAWA *et al.*, 1965), causa convulsão em camundongos (JAMME *et al.*, 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente Na^+ (LI e STYS, 2001) e provoca morte celular no hipocampo de ratos (LEES *et al.*, 1990). Além disso, a supressão genética da NKA causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (MOSELEY *et al.*, 2007).

A agrina foi identificada como uma proteína capaz de interagir fisicamente com a NKA e modular diretamente sua atividade. Ao ligar-se na subunidade α_3 da enzima, a agrina inibe sua atividade (HILGENBERG *et al.*, 2006). Essa proteína foi primeiramente descoberta por induzir o acúmulo de receptores para acetilcolina na junção pós-sináptica neuromuscular durante a embiogênese (MAGILL *et al.*, 1987; RUPP *et al.*, 1992). A agrina é uma proteoglicana de heparan sulfato responsável pela manutenção e regeneração da junção neuromuscular e com papel essencial na sua formação, porém a sua função em outros tecidos como rim e sistema imunológico não é clara. No SNC a agrina está amplamente expressa, concentrando-se nas sinapses interneurais, onde evidências apontam para funções durante o crescimento axonal e sinaptogênese, e no desenvolvimento da barreira hematoencefálica (KROGER e SCHRODER, 2002).

Semelhanças morfológicas, bioquímicas e funcionais entre as junções neuromusculares e as sinapses no SNC, juntamente com a ampla expressão da agrina nesses tecidos, principalmente durante o desenvolvimento, sugeriram que a agrina poderia desempenhar um papel similar na formação das sinapses interneuronais ao desempenhado na junção neuromuscular. Assim, demonstrou-se que a agrina está concentrada na fenda sináptica das sinapses interneurais (KROGER e SCHRODER, 2002). Além disso, transcritos que codificam as isoformas de agrina não estão limitados aos neurônios colinérgicos, sendo expressos ao longo do SNC tanto em neurônios quanto em células da glia. Os níveis transcricionais de agrina no SNC em desenvolvimento são mais altos durante a fase de alongamento axonal e sinaptogênese, com posterior decaimento, de modo que no cérebro adulto pequenas quantidades são expressas.

Entretanto, a expressão de RNA mensageiro para agrina em regiões específicas do cérebro de ratos adultos é aumentada após a indução a crises convulsivas, sugerindo que a expressão da agrina pode ser regulada pela atividade neuronal (O'CONNOR *et al.*, 1995; KROGER e SCHRODER, 2002).

Embora o estudo da função da agrina durante a sinaptogênese *in vivo* mostrou-se difícil, uma vez que camundongos nocautes para agrina morrem ao nascimento e a sinaptogênese na maioria das regiões do cérebro inicia depois da primeira ou segunda semana pós-natal. Não se observou diferenças no número e morfologia das sinapses formadas no tecido hipocampal de embriões de 18 dias de camundongos selvagens e nocautes para agrina (SERPINSKAYA *et al.*, 1999). Cultura de hipocampo ou córtex de camundongos nocaute para agrina também não apresentaram diferenças para de camundongos selvagens, com distribuições normais de glutamato e receptores GABA e função normal da transmissão sináptica, o que poderia indicar que a agrina não influencia de forma crítica na sinaptogênese dos neurônios, sugerindo que os neurônios no SNC usam de mecanismos diferentes dos moto neurônios (KROGER e SCHRODER, 2002).

Contrastando com os resultados obtidos em animais nocaute para agrina, a inibição aguda da sua síntese por oligonucleotídeos antisense ou anticorpos bloqueadores resulta em uma menor formação de sinapses funcionais. Nesses experimentos foi visto uma diminuição no tamanho, na frequência e na probabilidade de correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura, entre neurônios vizinhos de culturas de células do SNC de animais selvagens. Além de um comprometimento do desenvolvimento dendrítico, inibição de agrupamento proteico associado à sinapse e um ciclo de vesículas sinápticas possivelmente comprometido (BOSE *et al.*, 2000). Assim, uma explicação para a sinaptogênese aparentemente normal no SNC de camundongos com deficiência de agrina pode ser a ativação de mecanismos compensatórios durante as fases iniciais do desenvolvimento neuronal, sugerindo que a agrina é, no máximo, apenas um dos vários reguladores possivelmente envolvidos na formação das sinapses interneuronais (KROGER e SCHRODER, 2002).

Apesar de Hilgenberg e colaboradores (2006) reportarem que o fragmento terminal de 20 kDa da agrina se ligava a NKA α_3 e causava a inibição na sua atividade, esse experimento não foi reproduzido, podendo os efeitos excitatórios da agrina ser por outros mecanismos ainda não elucidados (KHORSHIDI, 2013). Contraditoriamente, também foram demonstrados efeitos inibitórios no SNC para a agrina de 50 kDa, em experimentos que resultaram em redução da alodínia e hiperalgesia com aumento da transmissão gabaérgica (CUI e BAZAN, 2010).

A agrina é expressa em altos níveis nos cérebros de pacientes com Alzheimer, representando o principal proteoglicano associado com as características morfológicas da doença como emaranhados neurofibrilares, angiopatia amiloide cerebral e placas neuríticas (BOSE *et al.*, 2000). Em um experimento de imunoreatividade a agrina se mostrou colocalizada com depósitos de placas da proteína β -amiloide no cérebro de pacientes com Alzheimer. A ligação da agrina acelera a formação das placas β -amiloides, protegendo-as da proteólise e alterando sua solubilização, sugerindo que a agrina pode não ser apenas um componente estrutural das placas senis, mas também um importante fator de deposição, agregação e/ou persistência dessas placas β -amiloides tendo um importante papel na progressão do Alzheimer (COTMAN *et al.*, 2000).

A neurotripsina é uma serina protease sináptica considerada essencial para o estabelecimento e manutenção das funções cerebrais cognitivas, já que seres humanos sem essa proteína funcional sofrem de retardo mental grave (STEPHAN *et al.*, 2008). No cérebro, a agrina é clivada pela neurotripsina em dois sítios, gerando os fragmentos de 90 kDa e 22 kDa, que são responsáveis pelas diversas atividades da proteína. Análises morfológicas indicam que a neurotripsina está contida nos terminais pré-sinápticos e é externalizada dependendo da atividade sináptica, enquanto a agrina está localizada no espaço extracelular ou próximo das sinapses. Uma vez que a agrina demonstrou ter um papel importante na formação e manutenção de sinapses excitatórias no SNC, o seu local de clivagem na sinapse implica na regulação das reorganizações adaptativas dos circuitos sinápticos no contexto de funções cognitivas, como aprendizado e memória (STEPHAN *et al.*, 2008). Indicando um complexo envolvimento da agrina nas funções do SNC, assim como seu papel em doenças como a epilepsia.

3.3 HIPÓTESE

Ao considerarmos que no SNC a diminuição da atividade da NKA afeta diretamente a sinalização celular, a sua manipulação farmacológica pode representar uma estratégia na busca de esclarecimentos dos mecanismos envolvidos na epilepsia, ou até mesmo novas terapias. Nossa hipótese de trabalho é que o anticorpo DRSSAb através da ativação da enzima NKA é capaz de melhorar os parâmetros neuroquímicos e respostas comportamentais dos animais epiléticos. Em relação a agrina, por ser uma proteína associada com a excitabilidade neuronal, nossa hipótese é que seus níveis estariam aumentados nos animais epiléticos, e que esse aumento facilitaria a ocorrência das crises epiléticas.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O desenvolvimento desta tese está apresentado sob a forma de dois artigos científicos, um deles publicado no periódico *Neuroscience* e o outro submetido para o periódico

Experimental Neurology. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos, os quais estão estruturados de acordo com as normas de cada revista. Em anexo a esta tese encontram-se a carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (Anexo A) e a autorização da editora para reprodução de material sob copyright (Anexo C).

Na⁺, K⁺-ATPase Activating Antibody Displays *in vitro* and *in vivo* Beneficial Effects in the Pilocarpine Model of Epilepsy

Mayara Lütchemeyer de Freitas,^a Clarissa Vasconcelos de Oliveira,^a Fernanda Kulinski Mello,^a Vinicius Rafael Funck,^a Michele Rechia Figuera,^a Luiz Fernando Freire Royes,^a Ana Flávia Furian,^a James W. Larrick^b and Mauro Schneider Oliveira^{a*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^b Panorama Research Institute, 1230 Bordeaux Dr, Sunnyvale, CA 94089, United States

Abstract—Na⁺, K⁺-ATPase is an important regulator of brain excitability. Accordingly, compelling evidence indicates that impairment of Na⁺, K⁺-ATPase activity contributes to seizure activity in epileptic mice and human with epilepsy. In addition, this enzyme is crucial for plasma membrane transport of water, glucose and several chemical mediators, including glutamate, the major excitatory transmitter in the mammalian brain. Since glucose hypometabolism and increased glutamate levels occur in clinical and experimental epilepsy, we aimed the present study to investigate whether activation of Na⁺, K⁺-ATPase activity with specific antibody (DRRSAb) would improve glucose uptake and glutamate release in pilocarpine-treated mice. We found decreased uptake of the glucose fluorescent analog 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-desoxy-D-glucose (2-NBDG) in cerebral slices from pilocarpine-treated animals. Interestingly, decreased 2-NBDG uptake was not detected in DRRSAb-treated slices, suggesting a protective effect of the Na⁺, K⁺-ATPase activator. Moreover, DRRSAb prevented the increase in glutamate levels in the incubation media of slices from pilocarpine-treated mice. In addition, *in vivo* intrahippocampal injection of DRRSAb restored crossing activity of pilocarpine-treated mice in the open-field test. Overall, the present data further support the hypothesis that activation of the Na⁺, K⁺-ATPase is a promising therapeutic strategy for epilepsy. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: sodium pump, epilepsy, pilocarpine, hypometabolism, excitotoxicity.

INTRODUCTION

The Na⁺, K⁺-ATPases constitute a family of plasma membrane proteins which have a crucial role in maintaining ionic homeostasis in virtually all mammalian cells (Aperia, 2012). By adjusting the gradient of Na⁺ and K⁺ across the plasma membrane, this enzyme indirectly modulates the intracellular concentration of other ions such as Ca²⁺, Cl⁻ and H⁺, as well as the transmembrane movement of water, glucose and several chemical mediators (Aperia, 2012). In the brain, the Na⁺, K⁺-ATPase is a major regulator of neuron excitability, being a primary contributor to the electrochemical gradient underlying neuronal after-hyperpolarization and resting potential (Gulledge et al., 2013). Moreover, Na⁺-coupled secondary transport of glutamate, the major exci-

tatory neurotransmitter in the mammalian brain, largely depends on the activity of the Na⁺, K⁺-ATPase. Furthermore, glutamate transporters and Na⁺, K⁺-ATPases are part of a macromolecular complex which regulates glutamatergic neurotransmission (Rose et al., 2009).

Many neurological disorders have been associated with changes in the activity of the Na⁺, K⁺-ATPases (Aperia, 2007; Benarroch, 2011; Holm et al., 2016). For instance, reduced Na⁺, K⁺-ATPase activity contributes to the initiation and/or spreading of seizures in epileptic mice and human epilepsy (Clapcote et al., 2009; Poulsen et al., 2010; Holm et al., 2016). Moreover, decreased Na⁺, K⁺-ATPase activity has been found in the epileptic human cerebral cortex (Rapport et al., 1975) and in the hippocampus of mice in the pilocarpine post-status epilepticus (SE) model of epilepsy (Funck et al., 2014). Altogether, these clinical and experimental findings may support Na⁺, K⁺-ATPase as an interesting target for epilepsy. In support of this point, we and others recently reported that intrahippocampal injection of DRRSAb, a site-specific antibody which activates the Na⁺, K⁺-ATPase (Zheng et al., 2011; Funck et al., 2015), decreased seizure susceptibility in post-SE mice (Funck et al., 2015).

*Corresponding author. Address: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, n° 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: + 55-55-3220-8241.

E-mail address: ms.oliveira@ufsm.br (M. S. Oliveira).

Abbreviations: 2-NBDG, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-desoxy-D-glucose; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; AMC, aminomethylcoumarin; FRAP, ferric-reducing antioxidant power; SE, status epilepticus; TLE, temporal lobe epilepsy.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.044>

0306-4522/© 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Considering that glucose hypometabolism and increased glutamate levels are typically found in temporal lobe epilepsy (TLE) in humans (Cavus et al., 2005; Boling et al., 2008) and experimental models (Upreti et al., 2012; Zhang et al., 2015), and that these neurochemical parameters depend on the activity of the Na^+ , K^+ -ATPase, we sought to investigate the effect of DRRSAb antibody on glucose uptake and glutamate release in post-SE mice. In addition, since behavioral comorbidities are difficult to treat in many patients with epilepsy (Berg et al., 2017), and Na^+ , K^+ -ATPase activity modulates locomotor activity, anxiety- and depressive-like behavior (Moseley et al., 2007; Kirshenbaum et al., 2011), we evaluated the effect of DRRSAb antibody on behavioral tests in post-SE mice.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Ninety-three male C57BL/6 mice (20- to 25-g; 35- to 45-day-old) from the institutional vivarium of the Federal University of Santa Maria were used. Animals were kept under an artificial light–dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00) and in a room with controlled temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Mice had free access to filtered water and rodent chow (Purotrato™, Santa Maria, RS, Brazil). Experimental design was planned to keep the number of animals to a minimum as well as to minimize their suffering. Studies were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (protocol number 6262060616).

DRRSAb antibody

The polyclonal rabbit antibody DRRSAb binds to an activation site located at the $^{897}\text{DVEDSYGQQTWEQR}^{911}$ (D-R) region of the α -subunit of the Na^+ , K^+ -ATPase (Zheng et al., 2011). Binding of DRRSAb alters Na^+ , K^+ -ATPase conformation and increases its Mg^{2+} /ATP affinity, augmenting Na^+ / K^+ transport (Xu, 2005). The batch used in the present study was kindly provided by Dr. James W. Larrick (Panorama Research Inc., Sunnyvale, CA, USA). The concentration and schedule for DRRSAb incubation was based on the literature (Zheng et al., 2011; Funck et al., 2015) and on pilot experiments. Doses and schedule for *in vivo* injection of DRRSAb was based on our previous study (Funck et al., 2015).

Pilocarpine-induced SE

To induce SE we used a ramping protocol based on repetitive administration of low doses of pilocarpine (100 mg/kg, i.p.) (Groticke et al., 2007). Importantly, this approach has been shown to increase the number of mice displaying SE and to reduce mortality after SE. Briefly, thirty minutes before the injections of pilocarpine, mice

received methylscopolamine (1 mg/kg, i.p.) to minimize peripheral cholinergic effects. Pilocarpine hydrochloride (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri) was dissolved in 0.9% NaCl to 10 mg/mL and intraperitoneally administered every 20 min until onset of SE. Regarding this point, after injection of pilocarpine animals displayed a diverse behavioral repertoire (“limbic seizures”) that included tremor or twitches involving head, limbs and/or whole body, forelimb and/or tail extensions (Winawer et al., 2011). In this context, SE was defined by occurrence of continuous limbic seizures starting after a generalized seizure. The total number of pilocarpine injections was limited to 6 injections per animal. After 60 min of SE diazepam (10 mg/kg, i.p.) was injected to quell SE severity (Gualtieri et al., 2012). Age-matched controls received methylscopolamine and diazepam, but received only 0.9% NaCl instead of pilocarpine. In attempt to maximize animal welfare after SE all mice received softened chow and fresh fruits (apples and bananas) and daily injections of Ringer's solution (containing 5% dextrose) for three days following the SE or control procedure.

Hippocampal slices

All *in vitro* experiments were carried out on hippocampal slices since decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity has been found in this brain area after pilocarpine-induced SE (Funck et al., 2014). Horizontal slices (350- μm -thick) of hippocampi and associated entorhinal cortices were prepared (Upreti et al., 2012) from pilocarpine-treated and age-matched control mice 40–60 days after SE. Mice were decapitated and their brains were rapidly obtained and immersed in ice-cold sucrose-based cutting solution (in mM: 87 NaCl, 25 NaHCO_3 , 10 glucose, 75 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 0.5 CaCl_2 and 4 MgCl_2). Slicing procedures were performed at 4°C using a VT1000S vibratome (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany). Slices were kept in cutting solution at 32°C for 30 min, and then transferred to a holding chamber at room temperature containing artificial cerebrospinal fluid (aCSF; in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , 25 glucose and 10 sucrose). The solutions used for slice preparation and incubation were adjusted to pH 7.4, 290–310 mOsm and continuously aerated with carbogen (95% O_2 /5% CO_2). Slices were allowed to rest and equilibrate for at least 60 min before starting an experiment. Slice viability was checked in every experiment by measuring LDH release in the incubation media (Oliveira et al., 2009).

Glucose uptake

Glucose uptake was measured in hippocampal slices using the glucose fluorescent analog 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-desoxy-D-glucose (2-NBDG) according to the methodology described by Itoh et al. (2004) with brief modifications. After a 60-min equilibration period the hippocampal slices from control and pilocarpine-treated animals were transferred to individual tubes (2–3 slices per treatment) and preincubated for 15 min in either aCSF (control) or DRRSAb (3 μM). After preincubation the medium of all tubes was replaced by aCSF containing 2-NBDG (30 μM) and incubation was continued for 15 min.

Following incubation, slices were gently washed in aCSF to allow removal of residual nonphosphorylated 2-NBDG. After washing slices were homogenized in 30 mM Tris–HCl buffer (pH = 7.4), centrifuged at 3000g for 10 min and protein of supernatant was adjusted to 0.1 mg/mL. Fluorescence was measured in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) (excitation at 485 nm and emission at 538 nm) and the amount of 2-NBDG was calculated based on a standard curve. To minimize inter-day variability, data were normalized to daily average values of control slices incubated respectively with aCSF or DRRSAb.

Glutamate release

The release of glutamate by hippocampal slices was measured according to the methodology described by Takemiya et al. (2011). After a 60-min equilibration period the hippocampal slices from control and pilocarpine-treated animals were transferred to individual tubes (2–3 slices per treatment) and incubated for 30 min in either aCSF (control) or DRRSAb (3 μ M). After incubation, the medium of all tubes was collected and the protein of the supernatant was adjusted to 0.1 mg/mL. The amount of glutamate released in the medium was quantified in microplates using a commercially available fluorometric kit (Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit, ThermoFischer Scientific) per manufacturer's instructions. Fluorescence readings were carried out in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) (excitation at 544 nm and emission at 590 nm).

Redox potential

Total redox potential of hippocampal slices was estimated through the ferric-reducing antioxidant power (FRAP) method (Bolanos de la Torre et al., 2015). After a 60-min equilibration period the hippocampal slices from control and pilocarpine-treated animals were transferred to individual tubes (2–3 slices per treatment) and incubated for 30 min in either aCSF (control) or DRRSAb (3 μ M). At the end of the incubation, slices were homogenized in aCSF and homogenate protein was adjusted to 0.1 mg/mL. FRAP assays were carried out in a medium containing 25 μ L of hippocampal homogenate and 275 μ L of freshly prepared FRAP working solution (prepared by mixing 25 mL of 300 mM acetate buffer pH 3.6, 2.5 mL of 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine and 2.5 mL of 20 mM ferric chloride). After incubation for 60 min at 37 °C, absorbance was read at 593 nm in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Caspase-3 assay

Activity of caspase-3 was measured in hippocampal slices using a commercially available fluorometric kit (EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1, Z-DEVD-AMC substrate, ThermoFischer Scientific) per manufacturer's instructions. After a 60-min equilibration period, the hippocampal slices from control and pilocarpine-treated animals were transferred to individual tubes (2–3 slices

per treatment) and incubated for 30 min in either aCSF (control) or DRRSAb (3 μ M). At the end of the incubation period, slices were homogenized in 30 mM Tris–HCl buffer (pH = 7.4) and protein of homogenates was adjusted to 0.1 mg/mL. An aliquot of homogenate (50 μ L) was mixed with 50 μ L of freshly prepared working solution and incubated for 60 min at 37 °C. The amount of aminomethylcoumarin (AMC) derived from the substrate Z-DEVD-AMC after caspase-3 cleavage was quantified in microplates. Fluorescence readings were carried out in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) (excitation at 355 nm and emission at 460 nm).

In vivo experiments

The effect of DRRSAb on pilocarpine-treated and age-matched control mouse performance in the open-field or sucrose splash tests was evaluated 40–60 days after SE. Details of the surgical procedures required for cannula implantation and intrahippocampal injections are described in detail elsewhere (Funck et al., 2015). Behavioral experiments occurred 5–7 days after surgery. Intrahippocampal injections were performed over a 1-min period by using a 30-gauge needle protruding 1 mm below the guide cannula. Five minutes after the intrahippocampal injection the animals were placed in a round open-field apparatus (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. The number of crossed areas (crossing) was recorded for 10 min to evaluate spontaneous locomotor activity and anxiety-like behavior. Immediately after the open-field test animals were subjected to the sucrose splash test (Isingrini et al., 2010). In this test, each mouse received a squirting of a 10% sucrose solution on the dorsal coat, and the time spent grooming was recorded for a period of 5 min as an index of self-care and motivational behavior (Isingrini et al., 2010).

Statistical analyses

A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test was used to analyze all data. In all cases a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Effect of DRRSAb on glucose uptake by brain slices

To investigate whether DRRSAb antibody would alter glucose uptake in combined hippocampal entorhinal cortex slices we measured the uptake of the glucose fluorescent analog 2-NBDG in cerebral slices from pilocarpine-treated animals. The effect of DRRSAb on glucose uptake is shown in Fig. 2. Levels of 2-NBDG in slices from pilocarpine-treated animals were decreased in comparison to slices from age-matched controls. The decrease in 2-NBDG uptake was not detected in DRRSAb-incubated slices from pilocarpine-treated animals, suggesting a protective effect of the Na⁺, K⁺-ATPase activator.

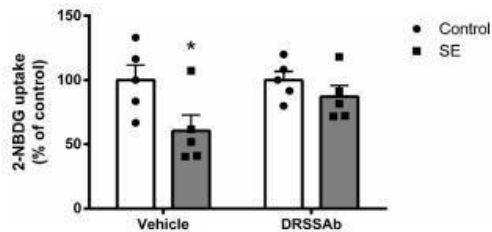


Fig. 1. DRRSAb prevents the decrease in glucose uptake in hippocampal slices of pilocarpine-treated mice. In this set of experiments the amount of the glucose fluorescent analog 2-NBDG was measured following incubation of hippocampal slices with DRRSAb (3 μ M) for 30 min. Data are presented as mean + SEM for $n = 5$ in each group, from three different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the control group.

Effect of DRRSAb on glutamate release by brain slices

In the second set of experiments we evaluated whether incubation of brain slices with DRRSAb antibody would alter glutamate release in the incubation media. Fig. 1 shows the effect of incubation with DRRSAb on glutamate release from combined hippocampal entorhinal cortex slices. Slices from pilocarpine-treated animals had higher levels of glutamate in the supernatant than slices from age-matched controls. Incubation with DRRSAb prevented the increase in glutamate levels in the incubation media of slices from pilocarpine-treated mice.

Effect of DRRSAb on viability of brain slices

To investigate whether SE changes in glutamate release or glucose uptake mitigated by DRRSAb was due to differences in the viability of slices, we measured a series of parameters related to redox potential (FRAP, Fig. 3A), apoptosis (caspase-3 activity, Fig. 3B) and plasma membrane integrity (LDH release in the

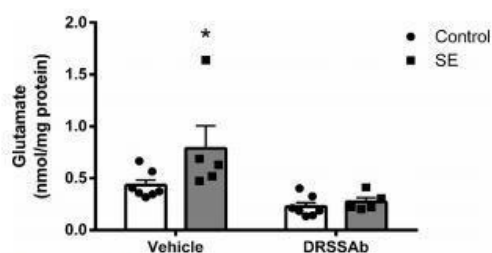


Fig. 2. DRRSAb prevents the increase in glutamate levels in hippocampal slices of pilocarpine-treated mice. In this set of experiments glutamate levels were measured following incubation of hippocampal slices with DRRSAb (3 μ M) for 30 min. Data are presented as mean + SEM for $n = 5-7$ in each group, from three different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the control group.

incubation media, Fig. 3C). Under our present experimental conditions, no significant differences between slices from control and pilocarpine-treated animals or between aCSF- and DRRSAb-treated slices were found. Altogether, these results suggest that increased glutamate release and decreased glucose uptake in the slices from pilocarpine-treated animals, as well as the protective effects of DRRSAb were not due to differences in viability of hippocampal slices.

Effects of DRRSAb on mice behavior

Since the *in vitro* experiments revealed beneficial effects of DRRSAb on glutamate release and glucose uptake, and a previous study showed anticonvulsant-like effects of this antibody *in vivo* (Funck et al., 2015), we evaluated whether the intrahippocampal injection of DRRSAb would alter the behavior of mice in the open-field or sucrose splash tests. As expected, pilocarpine-treated mice exhibited fewer crossings (Fig. 4A) than controls. Interestingly, intrahippocampal injection of DRRSAb protected against the decreased number of crossings. In the sucrose splash test, pilocarpine-treated mice spent less time engaged in dorsal grooming behavior (Fig. 4B). The intrahippocampal injection of DRRSAb did not affect licking time in control or pilocarpine-treated animals.

DISCUSSION

Glutamate is a major excitatory neurotransmitter which plays a fundamental role in several brain functions, from learning and memory to neurodegeneration (Lau and Tymianski, 2010). Accordingly, a fine-tuning regulation of release, uptake and recycling of glutamate is required to maintain the levels of this neurotransmitter within the physiological range and therefore below a toxic level (Danbolt et al., 2016). In this context, increase in extracellular glutamate levels has been considered as a key factor in neurological disorders, including epilepsy. In fact, extracellular glutamate levels in the hippocampus of patients with refractory TLE increase dramatically not only during spontaneous seizures (During and Spencer, 1993), but are also abnormally elevated in the interictal period, under basal conditions (Cavus et al., 2005). Moreover, microdialysis trials in refractory TLE patients revealed a significant negative correlation between extracellular glutamate in the epileptogenic hippocampus and hippocampal volume (Cavus et al., 2008), further supporting the deleterious role of elevated levels of glutamate in epilepsy. In the present study, we found increased levels of glutamate in the incubation media of hippocampal slices from pilocarpine-treated animals, which is consistent with elevated levels of glutamate in basal, unstimulated conditions in the epileptic brain. Importantly, incubation with DRRSAb prevented the increase in glutamate, indicating that activation of Na^+ , K^+ -ATPase in the hippocampus of pilocarpine-treated mice may constitute a novel mechanism to normalize glutamate levels suggesting a potential target for new treatment strategies.

Glucose hypometabolism has been demonstrated in the hippocampus of patients with refractory TLE (Boling et al., 2008) and in the pilocarpine rat model of epilepsy

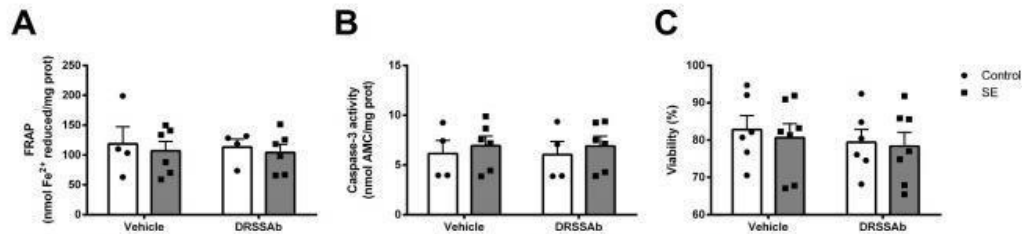


Fig. 3. SE-induced alterations and the DRRSAb protective effects are not due changes in viability of slices. In this set of experiments the (A) redox potential (FRAP), (B) caspase-3 activity and (C) LDH release were measured following incubation of hippocampal slices with DRRSAb (3 μ M) for 30 min. Data are presented as mean + SEM for $n = 4$ –6 (FRAP or caspase-3 activity) or 6–7 (LDH release) in each group, from three different experiments.

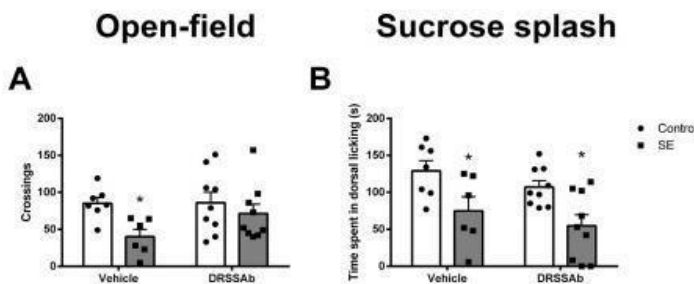


Fig. 4. Effect of DRRSAb on mice performance in the open-field and sucrose splash tests. In this set of experiments mice received an intrahippocampal injection of DRRSAb (1 μ g/site) and the (A) number of crossings, and (B) time spent in dorsal licking was recorded. Data are presented as mean + SEM for $n = 6$ –8 in each group, from three different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective control group.

(Zhang et al., 2015). Although glucose hypometabolism has been traditionally associated with neuronal loss, increasing evidence indicates that it may also be a consequence of neural plasticity in the epileptic brain rather than tissue damage, and therefore may contribute to the ongoing epileptic network (Zhang et al., 2015). In fact, impairment of energy production impacts synaptic transmission and several processes which may be relevant to the generation and propagation of seizures in acquired, chronic epilepsy (Zsurka and Kunz, 2015). In this context, the glucose uptake protective effect of DRRSAb antibody in the slices from pilocarpine-treated animals may be of relevance for future treatment strategies.

The open-field test is frequently used to evaluate locomotion, exploration, anxiety, and risk assessment in laboratory animals (Prut and Belzung, 2003). When placed in a novel environment, rodents tend to actively explore the area. Accordingly, decreased anxiety often results in increased exploratory activity, whereas increased anxiety causes the opposite behavior. In addition to the open-field test, here we carried out the sucrose splash test, which has been increasingly employed to investigate self-care and motivational behavior in rodents. Squirting a 10% sucrose solution on mice dorsal coat causes discomfort, and induces grooming behavior. This test has been pharmacologically validated, and decreased time spent in licking behavior is considered a

form of depressive- or anhedonia-like behavior (Isingrini et al., 2010).

Epilepsy in the pilocarpine model is characterized not only by spontaneous seizures, but also by abnormal behaviors resembling that of patients, and therefore it has been very useful to the study of the relationship between epilepsy and behavioral comorbidities (Curia et al., 2008). In the present study, we found that pilocarpine-treated mice exhibited a lower number of crossings in the open field and decreased time spent in dorsal licking. Such altered behaviors are consistent with previous reports in the pilocarpine model of epilepsy, and may either indicate increased anxiety, depressive-like behavior or a mixture

of both (Prut and Belzung, 2003). In this context, it is interesting to note that intrahippocampal injection of DRRSAb restored the number of crossings to the level of control animals, indicating a possible beneficial effect on the behavior of pilocarpine-treated mice. Although apparently small, we believe this effect cannot be underrated, since behavioral comorbidities of epilepsy are often pharmacoresistant and difficult to treat (Klee et al., 2015). On the other hand, it is not clear why DRRSAb restored crossing behavior but did not change mice performance in the splash test. One possibility is that behavioral alterations related to depressive-like behavior are more profound and difficult to treat. Regarding this point, it is interesting to note that depressive-like behavior in pilocarpine-treated mice is resistant to the classical and highly effective antidepressant Fluoxetine (Mazarati et al., 2008).

CONCLUSION

In the present study incubation with the Na^+ , K^+ -ATPase activator DRRSAb restored to normal the increase in glutamate release and decrease in glucose uptake observed in hippocampal slices from pilocarpine-treated animals. In addition, *in vivo* intrahippocampal injection of DRRSAb increased the number of crossings of pilocarpine-treated animals in the open-field test.

Collectively, these results constitute novel, further evidence for a role of the activation of the Na⁺, K⁺-ATPase as a novel target for the treatment of epilepsy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1, #471666/2013-0 and #305956/2012-4) and from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grant #2349-2551/14-5). The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to M.L.F., C.V.O. and V.R.F.) and CNPq/Pibic (F.K.M.). M.R.F., L.F.F.R., A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. Authors kindly acknowledge Naiéli Schiefelbein Souto, Micheli Dassi and Ana Claudia Monteiro Braga for technical assistance with the sucrose splash test and to Gustavo Cassol and Luis Roberto Hart da Silva for technical assistance with surgical procedures.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

M.L.F. performed experiments, interpreted data and drafted the manuscript. C.V.O., F.K.M. and V.R.F. performed experiments and drafted the manuscript. M.R.F., L.F.F.R., A.F.F. and J.W.L. provided reagents, materials, gave technical support and conceptual advice and drafted the manuscript. M.S.O. designed and supervised the study, analyzed data and edited the manuscript.

REFERENCES

- Aperia A (2007) New roles for an old enzyme: Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 261:44–52.
- Aperia A (2012) 2011 Homer Smith Award: to serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol* 23:1283–1290.
- Benarroch EE (2011) Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76:287–293.
- Berg AT, Altalib HH, Devinsky O (2017) Psychiatric and behavioral comorbidities in epilepsy: a critical reappraisal. *Epilepsia* 58:1123–1130.
- Bolanos de la Torre AA, Henderson T, Nigam PS, Owusu-Apenten RK (2015) A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem* 174:119–123.
- Boling WW, Lancaster M, Kraszpulski M, Palade A, Marano G, Puce A (2008) Fluorodeoxyglucose-positron emission tomographic imaging for the diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery* 63:1130–1138 (discussion 1138).
- Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, Jacob R, Gueorgieva R, Sherwin RS, Krystal JH, Spencer DD, Abi-Saab WM (2005) Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol* 57:226–235.
- Cavus I, Pan JW, Hetherington HP, Abi-Saab W, Zaveri HP, Vives KP, Krystal JH, Spencer SS, Spencer DD (2008) Decreased hippocampal volume on MRI is associated with increased extracellular glutamate in epileptic patients. *Epilepsia* 49:1358–1366.
- Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Rodacker Schack V, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Minassian BA, Ackerley CA, Sled JG, Cortez MA, Henderson JT, Vilsen B, Roder JC (2009) Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺, K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14085–14090.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143–157.
- Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y (2016) Neuronal vs glial glutamate uptake: resolving the conundrum. *Neurochem Int* 98:29–45.
- During MJ, Spencer DD (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341:1607–1610.
- Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS (2014) Long-term decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108:1705–1710.
- Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Della-Pace ID, Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Larrick JW, Oliveira MS (2015) Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience* 298:171–179.
- Groticke I, Hoffmann K, Loscher W (2007) Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 207:329–349.
- Gualtieri F, Curia G, Marinelli C, Biagini G (2012) Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. *Neuroscience* 218:278–94.
- Gulledge AT, Dasari S, Onoue K, Stephens EK, Hasse JM, Avesar D (2013) A sodium-pump-mediated afterhyperpolarization in pyramidal neurons. *J Neurosci* 33:13025–13041.
- Holm TH, Isaksen TJ, Glerup S, Heuck A, Bottger P, Fuchtbauer EM, Nedergaard S, Nyengaard JR, Andreasen M, Nissen P, Lykke-Hartmann K (2016) Cognitive deficits caused by a disease-mutation in the alpha3 Na(+)K(+)ATPase isoform. *Sci Rep* 6:31972.
- Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C (2010) Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS ONE* 5:e10404.
- Itoh Y, Abe T, Takaoka R, Tanahashi N (2004) Fluorometric determination of glucose utilization in neurons in vitro and in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:993–1003.
- Kirshenbaum GS, Saltzman K, Rose B, Petersen J, Vilsen B, Roder JC (2011) Decreased neuronal Na⁺, K⁺-ATPase activity in Atp1a3 heterozygous mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. *Genes Brain Behav* 10:542–550.
- Klee R, Tollner K, Rankovic V, Romermann K, Schidlitzki A, Bankstahl M, Loscher W (2015) Network pharmacology for antiepileptogenesis: tolerability of multitargeted drug combinations in nonepileptic vs. post-status epilepticus mice. *Epilepsy Res* 118:34–48.
- Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460:525–542.
- Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R (2008) Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain* 131:2071–2083.
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB (2007) Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616–626.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416–426.

- Poulsen H, Khandelia H, Morth JP, Bublitz M, Mouritsen OG, Egebjerg J, Nissen P (2010) Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* 467:99–102.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33.
- Rapport 2nd RL, Harris AB, Friel PN, Ojemann GA (1975) Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch Neurol* 32:549–554.
- Rose EM, Koo JC, Antfflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na, K-ATPase. *J Neurosci* 29:8143–8155.
- Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K (2011) Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca²⁺ levels. *Neurochem Int* 58:489–496.
- Upreti C, Otero R, Partida C, Skinner F, Thakker R, Pacheco LF, Zhou ZY, Maglakelidze G, Veliskova J, Velisek L, Romanovicz D, Jones T, Stanton PK, Garrido-Sanabria ER (2012) Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 135:869–885.
- Winawer MR, Gildersleeve SS, Phillips AG, Rabinowitz D, Palmer AA (2011) Mapping a mouse limbic seizure susceptibility locus on chromosome 10. *Epilepsia* 52:2076–2083.
- Xu KY (2005) Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1669–1677.
- Zhang L, Guo Y, Hu H, Wang J, Liu Z, Gao F (2015) FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Int J Med Sci* 12:288–294.
- Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS (2011) Cardioprotection induced by Na⁺/K⁺-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res* 89:51–59.
- Zsurka G, Kunz WS (2015) Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet Neurol* 14:956–966.

(Received 26 June 2017, Accepted 27 February 2018)
(Available online 6 March 2018)

5 MANUSCRITO

O manuscrito apresentado nessa tese foi submetido a revista *Experimental Neurology* (Anexo B).

Agrin facilitates provoked seizures after pilocarpine-induced *status epilepticus* in mice

Mayara Lütchemeyer de Freitas¹, Clarissa Vasconcelos de Oliveira¹, Fernanda Kulinski Mello¹, Naieli Schiefelbein Souto², Ana Flávia Furian^{1,2}, Mauro Schneider Oliveira^{1,*}

¹Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

² Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, n°

1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@ufsm.br

Phone: 55 55 3220 9378

Fax: 55 55 3220 8241

Abstract

Na^+ , K^+ -ATPase is an important regulator of brain excitability, and changes of Na^+ , K^+ ATPase activity contribute to seizure activity in epileptic mice and human with epilepsy. Agrin is a protein implicated in several processes in the central nervous system, including synaptogenesis and control of neuronal excitability. It also physically interacts with Na^+ , K^+ ATPase and decrease its activity. However, knowledge about the potential role of Agrin in epilepsy remains limited. Therefore, we examined agrin expression after pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE) and tested the hypothesis that agrin facilitates seizure activity induced by low dose pentylenetetrazol (PTZ) in naïve and epileptic animals. Hippocampal agrin levels did not change 24 hours after SE. On the other hand, agrin levels decreased by 43 % when assessed 14 days after SE. Conversely, levels of agrin in mice hippocampus increased by 71 % 60 days after SE. We also investigated the immunoreactivity of neurotrypsin, a key protease involved in agrin metabolism. However, no changes in neurotrypsin immunoreactivity were detected 1, 14 or 60 days after pilocarpine-induced SE. Regarding seizure susceptibility, intrahippocampal injection of recombinant agrin (1 μg /hippocampus) did not affect PTZ-induced convulsions in age-matched control mice. On the other hand, agrin decreased the latency to myoclonic seizures in post SE mice compared to age-matched controls. The latency to tonic-clonic seizures or its severity were not altered by agrin injection. In summary, present data indicate agrin expression changes after pilocarpine-induced SE, and that agrin injection increases seizure susceptibility in post SE mice. Altogether, these results suggest agrin may constitute a pharmacological target for regulate brain excitability after SE and possibly in epilepsy.

Key words: Agrin, status epilepticus, epilepsy, pilocarpine, hyperexcitability

Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disease with an incidence of approximately 1% in the general population (BANERJEE e HAUSER, 2007; DICHTER *et al.*, 2007). The most prominent feature of epilepsy is the occurrence of epileptic seizures. These result from excessive and synchronous paroxysmal discharges of groups of neurons in the brain and cause enormous damage to the quality of life of the affected patients and of their families. In this context, while anticonvulsant therapy promotes the control of epileptic seizures in approximately 60-70% of patients, seizures remain uncontrollable in a significant number of individuals, even with the use of various drugs and different treatment regimens. In these refractory patients, the surgical resection of the cerebral epileptic focus becomes the last and most arduous therapeutic alternative (BEN-MENACHEM *et al.*, 2007).

One of the possible candidate for pharmacological targeting in epilepsy therapy is the Na⁺, K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) (APERIA, 2007b; BENARROCH, 2011). Na⁺, K⁺-ATPase is a plasma membrane protein that plays a crucial role in the maintenance of cellular ion homeostasis (SKOU e ESMANN, 1992; APERIA, 2012). The basic reaction catalysed by Na⁺, K⁺-ATPase is the export of three Na⁺ ions to the extracellular medium and the import of two K⁺ ions to the intracellular medium using energy from adenosine triphosphate (ATP) (SKOU e ESMANN, 1992; APERIA, 2012). By regulating the Na⁺ and K⁺ gradient across the plasma membrane, Na⁺, K⁺-ATPase indirectly modulates the intracellular concentration of other ions, such as Ca²⁺, Cl⁻ and H⁺, and of water, glucose and several neurotransmitters (SKOU e ESMANN, 1992; APERIA, 2012). Therefore, changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity directly affects cell signalling via neurotransmitters and neuronal excitability, as well as animal behaviour (MOSELEY *et al.*, 2007).

In recent years, several proteins have been found capable of physically interacting with Na⁺, K⁺-ATPase and directly modulate its activity. Among these proteins is Agrin (HILGENBERG *et al.*, 2006), which has been reported to inhibit of Na⁺, K⁺-ATPase activity.

Agrin was originally identified as a key chemical mediator in the biogenesis of the neuromuscular junction, where it induces post-synaptic accumulation of nicotinic receptors (MAGILL *et al.*, 1987; RUPP *et al.*, 1992). In addition to the participation in the development of the neuromuscular junction, Agrin has been implicated in several processes in the central nervous system, including synaptogenesis and control of neuronal excitability (COHEN *et al.*, 1997; HILGENBERG *et al.*, 2002). In this context, it has been shown that heterozygous mice for the gene encoding Agrin are less sensitive to the acute administration of excitotoxin kainic acid, suggesting a role for this protein in acutely induced epileptic seizures in naïve animals (HILGENBERG *et al.*, 2002). However, the potential role of Agrin in epilepsy remains unknown. Therefore, we examined agrin expression after pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE) and tested the hypothesis that agrin facilitates seizure activity induced by low dose pentylentetrazol (PTZ) in naïve and epileptic animals.

Methods

Animals

Male C57BL/6 mice (20-25 g) from the Federal University of Santa Maria were used. Animals were kept under an artificial light-dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00) and in a room with controlled temperature (22 ± 3 °C). Mice had free access to filtered water and standard lab chow (PurotratoTM, Santa Maria, RS, Brazil). Experimental design was planned to keep the number of animals to a minimum as well as to minimize their suffering. Studies were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (protocol number 6262060616/2016).

Pilocarpine-induced SE

To induce SE we used a ramping protocol based on repetitive administration of low doses of pilocarpine (100 mg/kg, i.p.) (GROTICKE *et al.*, 2007). This approach increase the number of mice displaying SE and to reduce mortality after SE. Briefly, thirty minutes before the injections of pilocarpine, mice received methylscopolamine (1 mg/kg, i.p.) to minimize peripheral cholinergic effects. Pilocarpine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) was dissolved in 0.9% NaCl to 10 mg/mL and intraperitoneally administered every 20 min until onset of SE, defined by occurrence of continuous limbic seizures starting after a generalized seizure. After 60 min of SE, diazepam (10 mg/kg, i.p.) was injected to quell SE severity (GUALTIERI *et al.*, 2012). Age-matched controls received methylscopolamine and diazepam but received 0.9% NaCl instead of pilocarpine. In attempt to maximize animal welfare after SE all mice received softened chow and fresh fruits (apples and bananas) and daily injections of Ringer's solution (containing 5 % dextrose) for three days following the SE or control procedure.

Western blotting

Agrin and neurotrypsin immunoreactivities at different timepoints after pilocarpine-induced SE were evaluated by western blot according to (FUNCK *et al.*, 2014), with minor modifications. In summary, hippocampus was dissected out and homogenized in T-PER Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL). Total protein was measured using a standard BCA kit (Pierce, Rockford, IL). After adjusting protein content to 1 µg/µl, 20 µg total protein was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to 0.2 µm nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin and incubated overnight with primary antibodies raised against Agrin (1:1.000) (R&D Systems, catalog #AF550) or neurotrypsin (Santa Cruz Biotechnology, catalog #sc-241572). After washing membranes were incubated for 1 h with HRP-linked secondary antibodies and developed for luminescence (Clarity ECL, Bio-Rad) in a Gel Logic 6000 PRO system

(Carestream Molecular imaging, Woodbridge, CT, USA). After antibody stripping, membranes were probed for β -actin (Santa Cruz Biotechnology, catalog #sc-47778). Blots were quantified with ImageJ software (RIID: nif-0000-30467). Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad; catalog #1610375) were used for molecular weight guidance and actin immunoreactivity served as the loading control.

Seizure susceptibility testing

In order to investigate the effect of agrin on long-term seizure susceptibility after an episode of status epilepticus (SE), we assessed seizure behavior induced by a low dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.). The effect of recombinant agrin (1 μ g, intrahippocampal) (R&D Systems, catalog #550-AG) on provoked seizures in pilocarpine-treated and age-matched controls was evaluated 50-60 days after SE. Details of the surgical procedures required for cannula implantation and intrahippocampal injections are described in detail elsewhere (WILLIS *et al.*, 2010; FUNCK *et al.*, 2015). Seizure susceptibility experiments occurred 5-7 days after surgery. Intrahippocampal injections were performed over a 1-min period by using a 30-gauge needle protruding 1 mm below the guide cannula. Fifteen min after the intrahippocampal injection the animals were placed in acrylic boxes and seizure behavior was evaluated for 15 minutes. Latencies to the first myoclonic and to the first tonic-seizure as well as maximal Racine score were recorded. Doses and schedules for agrin administration were chosen based on pilot experiments.

Statistical analyses

All data was analyzed by two-tailed unpaired Student's t test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant. Statistical values are shown only when significant.

Results

To investigate whether agrin expression changes after an epileptogenic event (e.g. pilocarpine-induced SE) we examined its protein levels (110 kDa agrin) in the hippocampus of post SE mice and age matched controls (Figure 1A). Hippocampal agrin levels did not change 24 hours after SE. On the other hand, agrin levels decreased by 43 % when assessed 14 days after SE [t(11) = 2.580; P = 0.0256]. Conversely, levels of agrin in mice hippocampus increased by 71 % 60 days after SE [t(12) = 3.040; P = 0.0103].

Since agrin levels were altered after SE, we examined the immunoreactivity of neurotrypsin, a key protease involved in the formation of smaller, neuroactive fragments of agrin (REIF *et al.*, 2007b; STEPHAN *et al.*, 2008). However, no changes in neurotrypsin immunoreactivity were detected 1, 14 or 60 days after pilocarpine-induced SE (Figure 1B).

In order to investigate the potential effects of altered levels of agrin on brain excitability after SE, we evaluated seizure susceptibility to a low dose of PTZ (30 mg/kg). Figure 2 shows the effect of intrahippocampal injection of recombinant agrin on PTZ-induced convulsions in control mice. In this experiment, no effects of agrin on the latency to myoclonic and tonic-clonic seizures or in the severity of tonic-clonic seizures were detected. On the other hand, statistical analysis revealed that agrin (1 µg/hippocampus) decreased the latency to myoclonic seizures in post SE mice compared to age-matched controls [t(12) = 3.134; P = 0.0086] (Figure 3A). The latency to tonic-clonic seizures or its severity were not altered by agrin injection (Figures 3B and 3C, respectively).

Discussion

Agrin is a large proteoglycan that plays a major role in the development of the neuromuscular junction during embryogenesis (KROGER e SCHRODER, 2002). In addition, agrin is widely expressed and concentrated at interneuronal synapses of the central nervous system, where it plays a role during synaptogenesis and development of the blood-brain barrier (KROGER e SCHRODER, 2002). Interestingly, there is evidence that agrin is also important in

brain disorders. For instance, agrin has been found to be a major proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain (VERBEEK *et al.*, 1998). In that disease, agrin seems to participate in formation of both senile plaques and neurofibrillary tangles (VERBEEK *et al.*, 1998), as well as in microvascular damage (BERZIN *et al.*, 2000), suggesting a deleterious role for increased agrin levels in Alzheimer's disease. Regarding this point, it is possible that the presently reported increase in agrin levels 60 days after SE also represents a potential long-term deleterious mechanism occurring after pilocarpine-induced SE. On the other hand, agrin levels decreased 14 days after SE. Interestingly, it is interesting to note that agrin levels decrease after transient focal brain ischemia, and that such a decrease has been considered a possible endogenous protective mechanism to counteract early edema formation (STEINER *et al.*, 2012). Altogether, these results indicate the regulation of agrin levels after a brain insult is complex and may be different depending on time point evaluated.

To examine the effects of increased agrin levels 60 days after SE, we tested seizure susceptibility to a low dose of PTZ (WILLIS *et al.*, 2010; FUNCK *et al.*, 2015). This convulsant has been extensively used for study of mechanisms underlying seizure activity, as well as in the screening of new anticonvulsants (LOSCHER, 2011). When used at low doses in previously injured animals, PTZ is useful to assess long term seizure susceptibility (GOLARAI *et al.*, 2001; WILLIS *et al.*, 2010; FUNCK *et al.*, 2015). In the present study, intrahippocampal agrin injection decreased latency to PTZ-induced myoclonic seizures in post SE animals. However, no changes in seizure behavior were seen in agrin-injected age-matched controls, suggesting the facilitatory effects of agrin on PTZ-induced seizures are not sufficient to induce behavioral seizure activity in non-injured animals. Regarding this point and considering that some effects of agrin may require proteolytic cleavage, we examined the immunoreactivity of neurotrypsin, a key protease involved in the formation of smaller, neuroactive fragments of agrin (REIF *et al.*, 2007a; STEPHAN *et al.*, 2008). However, no changes in neurotrypsin immunoreactivity were detected after pilocarpine-induced SE, suggesting the expression of this agrin-processing enzyme

was not altered. Nevertheless, we cannot rule out changes in neurotrypsin activity may occur independently of changes in enzyme levels, and therefore the possibility that post SE animals present altered neurotrypsin activity should be further investigated.

Regarding potential mechanisms underlying agrin-induced facilitation of seizures in post SE animals, it has been suggested that $\alpha 3$ isoform of Na^+ , K^+ -ATPase is a cellular receptor for agrin in neurons (HILGENBERG *et al.*, 2006). In fact, it has been shown that agrin is able to bind to the α subunit of Na^+ , K^+ -ATPase ($\alpha 3$ isoform), and that this binding reduces enzyme activity, causing neuronal depolarization and increased firing frequency of action potentials (HILGENBERG *et al.*, 2006). Alternatively, it has been demonstrated that Lrp4, a type I single transmembrane protein of the LDL receptor family, serves as a receptor for agrin in the central nervous system (SUN *et al.*, 2016b). Interestingly, Lrp4-knockout mice display increased latency to PTZ-induced seizures and decreased sensitivity to seizure development by repeated pilocarpine injection, further indicating a proconvulsant role for agrin. It is not clear, however, whether agrin-mediated inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase or activation of Lrp4 are linked to facilitation of seizure activity in the present (Figure 3A) or previous studies (HILGENBERG *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2016b), and therefore further studies shall address this point.

Conclusion

Present data indicate agrin expression changes after pilocarpine-induced SE, and that agrin injection increases seizure susceptibility in post SE mice. Altogether, these results suggest agrin may constitute a pharmacological target for regulate brain excitability after SE and possibly in epilepsy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1 and #471666/2013-0) and from

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) (grant #23492551/14-5). The authors gratefully acknowledge the student fellowships from CAPES (to M.L.F., C.V.O., N.S.S.) and CNPq/Pibic (to F.K.M.). A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships.

References

- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *Journal of internal medicine* 261, 44-52.
- Aperia, A., 2012. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol* 23, 1283-1290.
- Banerjee, P.N., Hauser, W.A., 2007. Incidence and prevalence. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. Editora Lippincott Williams & Wilkins 2^a Ed.
- Ben-Menachem, E., Chadwick, D.W., Moshé, S.L., Pellock, J.M., E., P., T.A., P., 2007. General Treatment Considerations. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. Editora Lippincott Williams & Wilkins 2^a Ed.
- Benarroch, E.E., 2011. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76, 287-293.
- Berzin, T.M., Zipser, B.D., Rafii, M.S., Kuo-Leblanc, V., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., Fallon, J.R., Stopa, E.G., 2000. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 349-355.
- Cohen, N.A., Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Rupp, F., 1997. Expression of agrin in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 76, 581-596.
- Dichter, M.A., Hauser, W.A., Vinters, H.V., T.A., P., 2007. Epidemiology, Pathology and Genetics of Epilepsy. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. Editora Lippincott Williams & Wilkins 2^a Ed.
- Funck, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Della-Pace, I.D., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Larrick, J.W., Oliveira, M.S., 2015. Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience* 298, 171-179.
- Funck, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., 2014. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108, 1705-1710.
- Golarai, G., Greenwood, A.C., Feeney, D.M., Connor, J.A., 2001. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 8523-8537.
- Groticke, I., Hoffmann, K., Loscher, W., 2007. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Experimental neurology* 207, 329-349.
- Gualtieri, F., Curia, G., Marinelli, C., Biagini, G., 2012. Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. *Neuroscience* 218, 278-294.

- Hilgenberg, L.G., Ho, K.D., Lee, D., O'Dowd, D.K., Smith, M.A., 2002. Agrin regulates neuronal responses to excitatory neurotransmitters in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* 19, 97-110.
- Hilgenberg, L.G., Su, H., Gu, H., O'Dowd, D.K., Smith, M.A., 2006. Alpha3Na⁺/K⁺-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell* 125, 359-369.
- Kroger, S., Schroder, J.E., 2002. Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. *News Physiol Sci* 17, 207-212.
- Loscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20, 359-368.
- Magill, C., Reist, N.E., Fallon, J.R., Nitkin, R.M., Wallace, B.G., McMahan, U.J., 1987. Agrin. *Prog Brain Res* 71, 391-396.
- Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B., 2007. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 616-626.
- Reif, R., Sales, S., Hettwer, S., Dreier, B., Gisler, C., Wolfel, J., Luscher, D., Zurlinden, A., Stephan, A., Ahmed, S., Baici, A., Ledermann, B., Kunz, B., Sonderegger, P., 2007a. Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 3468-3478.
- Reif, R., Sales, S., Hettwer, S., Dreier, B., Gisler, C., Wolfel, J., Luscher, D., Zurlinden, A., Stephan, A., Ahmed, S., Baici, A., Ledermann, B., Kunz, B., Sonderegger, P., 2007b. Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 3468-3478.
- Rupp, F., Hoch, W., Campanelli, J.T., Kreiner, T., Scheller, R.H., 1992. Agrin and the organization of the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 2, 88-93.
- Skou, J.C., Esmann, M., 1992. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24, 249-261.
- Steiner, E., Enzmann, G.U., Lin, S., Ghavampour, S., Hannocks, M.J., Zuber, B., Ruegg, M.A., Sorokin, L., Engelhardt, B., 2012. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia* 60, 1646-1659.
- Stephan, A., Mateos, J.M., Kozlov, S.V., Cinelli, P., Kistler, A.D., Hettwer, S., Rulicke, T., Streit, P., Kunz, B., Sonderegger, P., 2008. Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 1861-1873.
- Sun, X.D., Li, L., Liu, F., Huang, Z.H., Bean, J.C., Jiao, H.F., Barik, A., Kim, S.M., Wu, H., Shen, C., Tian, Y., Lin, T.W., Bates, R., Sathyamurthy, A., Chen, Y.J., Yin, D.M., Xiong, L., Lin, H.P., Hu, J.X., Li, B.M., Gao, T.M., Xiong, W.C., Mei, L., 2016. Lrp4 in astrocytes modulates glutamatergic transmission. *Nat Neurosci* 19, 1010-1018.
- Verbeek, M.M., Otte-Holler, I., Veerhuis, R., Ruiters, D.J., De Waal, R.M., 1998. Distribution of A beta-associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 96, 628-636.
- Willis, S., Stoll, J., Sweetman, L., Borges, K., 2010. Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. *Neurobiol Dis* 40, 565-572.

Figures

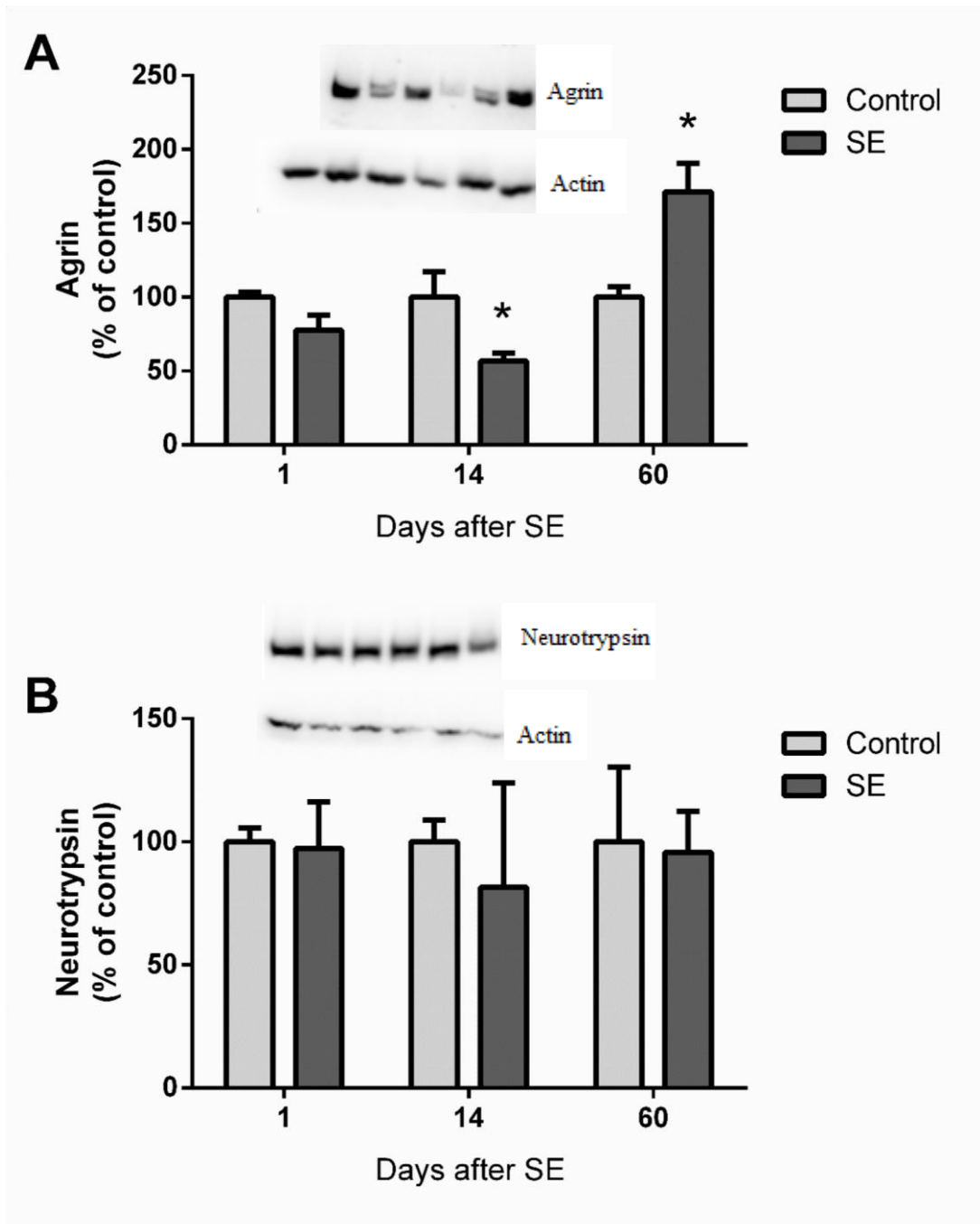


Figure 1. Expression of (A) agrin or (B) neurotrophin at different time points after pilocarpine-induced SE in mice. Data are shown as mean and standard error for $n = 5-8$ (A) or $3-6$ (B) per group. * Indicates difference of the respective age-matched control.

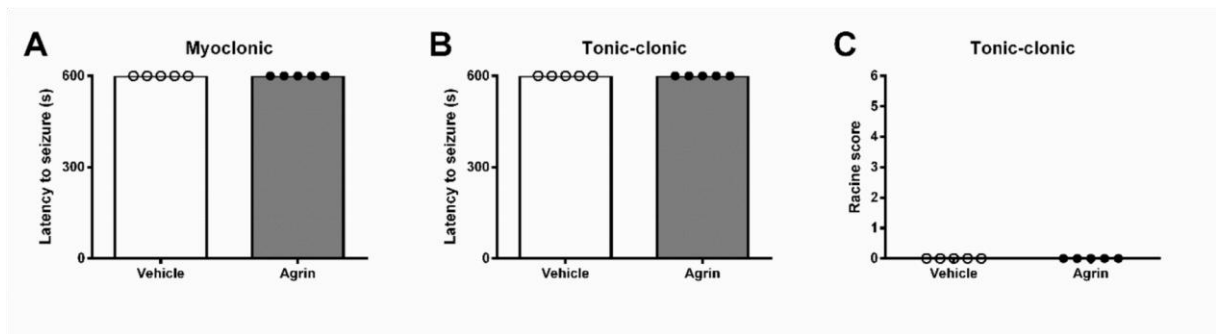


Figure 2. Effect of intrahippocampal administration of recombinant agrin (1 μ g) on latency to (A) myoclonic seizures, (B) tonic-clonic seizures or (C) severity of tonic-clonic seizures induced by low dose of PTZ in control animals. Data are shown as mean and standard error for $n = 5$ per group.

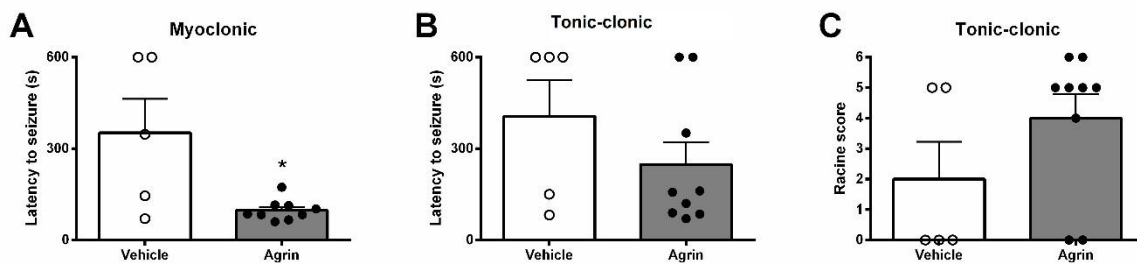


Figure 3. Effect of intrahippocampal administration of recombinant agrin (1 μ g) on latency to (A) myoclonic seizures, (B) tonic-clonic seizures or (C) severity of tonic-clonic seizures induced by low dose of PTZ in post-SE mice. Data are shown as mean and standard error for $n = 5-9$ per group. * Indicates difference of the vehicle-treated, age-matched control.

6 DISCUSSÃO

A epilepsia é a terceira doença crônica mais comum do cérebro e é caracterizada pela predisposição duradoura em gerar crises epiléticas. Apesar do progresso na farmacologia e nos tratamentos cirúrgicos, ainda é relativamente pouco o que se sabe sobre o processo que leva a geração das crises individuais, e sobre o mecanismo pelo qual um cérebro saudável se torna epilético. Essas lacunas em nosso conhecimento dificultam o desenvolvimento de melhores tratamentos preventivos e remissão da doença para aproximadamente 30% dos casos em que a epilepsia se mostra resistente as terapias atuais (VEZZANI *et al.*, 2011). Além disso, as terapias disponíveis são usada principalmente para as causas sintomáticas, uma vez que elas bloqueiam as crises, mas não possuem efeitos subjacentes sobre a patologia ou na progressão da doença (LAXER *et al.*, 2014).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na geração da epilepsia deve auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos que modifiquem o processo epileptogênico. Sendo de fundamental importância a concepção de novas estratégias terapêuticas eficazes na prevenção da epilepsia e suas comorbidades.

No cérebro a atividade da NKA é crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico, que por sua vez é responsável pelos potenciais de ação e repouso, e indiretamente pela captação e liberação de neurotransmissores e trânsito de outras moléculas como glicose, aminoácidos, água e íons (STAHL AND HARRIS, 1986). Assim, mudanças na atividade da NKA afeta diretamente a sinalização celular via neurotransmissores, atividade neuronal e conseqüentemente o comportamento do animal (MOSELEY, WILLIAMS *et al.* 2007). Sendo assim, um prejuízo ao funcionamento da NKA acarreta aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR, GUILLAUME *et al.*, 1992).

Em trabalhos desenvolvidos por grupos colaboradores da nossa linha de pesquisa é demonstrado que o grau de inibição da atividade da NKA induzido pela administração de ácido metilmalônico e ácido glutâmico em tecido cerebral estriado se correlaciona positivamente com a duração das crises epiléticas (FIGHERA *et al.*, 2006; FURIAN *et al.*, 2007). Uma correlação positiva entre a atividade da NKA e a latência para o início de crises epiléticas induzidas por PTZ no córtex de camundongos, também foi vista pelo nosso grupo de pesquisa (MARQUEZAN *et al.*, 2013). Esses trabalhos em conjunto reforçaram um papel importante da diminuição da atividade da NKA em crises epiléticas, porém são frente a uma crise induzida de forma aguda. Então, para avaliar o papel da NKA em um modelo de epilepsia de lobo temporal, que se caracteriza por alterações neurofisiológicas ao longo do tempo e o aparecimento de crises

epilépticas de forma espontânea e recorrente, foram feitos experimentos a partir do modelo da pilocarpina (FUNCK *et al.*, 2014).

Assim, em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, observou-se que a atividade da enzima NKA está diminuída no hipocampo de animais epilépticos (60 dias após o SE) no modelo da pilocarpina, e que essa diminuição na atividade está associada ao aumento da nitratação da subunidade α da enzima (FUNCK *et al.*, 2014). A partir desses resultados, afim de interferir na atividade da NKA, buscando um controle da sua atividade e reversão das alterações encontradas, testou-se o anticorpo DRSSAb. Um anticorpo que se liga a região D-R da NKA e aumentando sua atividade em cardiomiócitos (XU, 2005; XU *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009).

Esses experimentos demonstram que a incubação de homogeneizado de hipocampo com DRSSAb aumenta a atividade da NKA. E, que a injeção intrahipocampal do anticorpo é capaz de diminuir a suscetibilidade a convulsões mioclônicas no desafio ao PTZ em animais epilépticos. Em contrapartida, a mesma administração de DRSSAb em hipocampo de animais saudáveis demonstrou facilitar as crises induzidas por PTZ. Nos mostrando, mais uma vez, que a NKA requer uma fina regulação para manutenção do equilíbrio de um sistema excitável (FUNCK *et al.*, 2015).

Porém, mais estudos são necessários para definir o potencial da modulação da NKA como uma nova abordagem terapêutica para transtornos convulsivos. Dando início ao trabalho aqui apresentado. Com o objetivo de avaliar os efeitos do DRSSAb sob processos moleculares já definidos na epilepsia induzida pelo modelo da pilocarpina. E a efeito da agrina, uma proteína recentemente definida como inibidora da NKA, nesse mesmo modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.

O hipometabolismo da glicose e o aumento de glutamato extracelular são processos moleculares bem estabelecidos na epilepsia do lobo temporal (DURING e SPENCER, 1993; CAVUS *et al.*, 2005; BOLING *et al.*, 2008). Nos resultados apresentados podemos ver que o modelo da pilocarpina proposto foi capaz de reproduzir esses efeitos. Marcados pela diminuição da captação do 2-NBDG, um análogo fluorescente da glicose, e pelo aumento da liberação de glutamato em fatias hipocampais de camundongos de 60 dias após SE. De fato, esses processos parecem estar atrelados ao funcionamento da NKA, já que o a incubação das fatias com o anticorpo DRSSAb foi capaz de reverter esse quadro, aumentando a captação de 2-NBDG e diminuindo a liberação de glutamato ao meio. O uso de modelos *in vitro* buscam diminuir o uso de animais, a redução dos custos da pesquisa e facilitar experimentos que seriam de grande complexidade se realizados *in vivo*. Porém incapaz, de responder questões comportamentais, associadas ao sistema animal como um todo.

Assim, os experimentos comportamentais desenvolvidos nos trouxeram importantes resultados sobre o possível papel do reestabelecimento da atividade da NKA relacionado as comorbidades associadas a epilepsia. O teste de campo aberto reporta o comportamento explorador do animal quando em contato com um novo ambiente. Porém, com o aumento da ansiedade essa exploração se mostra diminuída (PRUT e BELZUNG, 2003), resultado esse visto nos animais tratados com pilocarpina. E, mais uma vez a NKA parece ter função nessa regulação, resultando em uma melhora comportamental do animal, vista pelo aumento no número de cruzamentos no teste do campo aberto, após o tratamento com o anticorpo.

Porém, no teste em que uma solução de sacarose de 10% é espirrada no dorso do camundongo, o tratamento com DRSSAb não foi capaz de reestabelecer o padrão comportamental dos animais controles. Esse experimento é caracterizado por causar desconforto no animal, levando-o a lambem o local, e uma diminuição no tempo de lambida passa a ser associado ao comportamento tipo depressivo ou anedônico. Provavelmente pelo fato do comportamento tipo depressivo de difícil tratamento (ISINGRINI *et al.*, 2010).

A agrina se mostrou uma proteína com influência no SNC, principalmente sob os processos de sinaptogênese e no controle da excitabilidade neuronal (HILGENBERG *et al.*, 2002; KROGER e SCHRODER, 2002). Assim, para um melhor esclarecimento do papel da agrina na epilepsia foi identificada a sua expressão nas diferentes etapas que envolve a epilepsia do lobo temporal. Através de uma lesão precipitante obtido pelo SE, após baixas doses repetidas de pilocarpina, caracterizado pela crise convulsiva tônico-clônica, o animal entra em um período latente sem a ocorrência de crises convulsivas, e um período posterior caracterizado pelo estabelecimento da epilepsia e a ocorrência de crises convulsivas espontâneas e recorrentes (LOTHMAN e BERTRAM, 1993).

No que diz respeito ao papel da agrina no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina, os resultados obtidos indicam que essa proteína tem papel facilitatório na geração de crises epiléticas, e desde que sua expressão está aumentada no hipocampo de animais epiléticos podemos sugerir que as vias de sinalização ativadas pela agrina constituem um possível alvo para ação de novos agentes anticonvulsivantes. Por outro lado, curiosamente no período de latência foi identificada uma diminuição expressão da agrina, em contraste ao aumento detectado no período crônico. Porém, sem modificação na expressão da neurotripsina, por ser a proteína responsável pela proteólise da agrina, e assim formação de fragmentos ativos desta, seria esperado que a expressão da neurotripsina acompanhasse as mudanças ocorridas com a expressão da agrina. Mesmo assim, não podemos excluir a possibilidade de a neurotripsina

estar com sua atividade aumentada mesmo sob níveis de expressão normais, já que esse parâmetro não foi abordado no trabalho e merecendo mais estudos.

Ao avaliarmos os efeitos da agrina no desafio ao PTZ, animais epiléticos apresentaram uma diminuição na latência para a primeira mioclonia. Mas animais controles não tiveram seu comportamento convulsivo antecipado, demonstrando que a agrina apresenta efeitos excitatórios frente a uma predisposição. Os mecanismos moleculares que envolvem esses achados precisam ser aprofundados. Nesse contexto, tem sido sugerido que a isoforma $\alpha 3$ da NKA é um receptor celular para a agrina em neurônios (HILGENBERG *et al.*, 2006), e que essa ligação reduz a atividade da enzima, causando despolarização neuronal e aumento da frequência de ativação dos potenciais de ação (HILGENBERG *et al.*, 2006). Entretanto, realizamos experimentos de avaliação da atividade da NKA frente a agrina, tanto no tecido cerebral dos animais que receberam agrina quanto *ex vivo*, incubando diretamente o homogeneizado de tecido cerebral com agrina, porém nenhum dos experimentos mostrou na inibição da NKA pela agrina. Alternativamente, foi demonstrado que a proteína-4 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (Lrp4), uma proteína transmembrana única do tipo I da família de receptores de LDL, serve como um receptor para a agrina no sistema nervoso central (SUN *et al.*, 2016a). Camundongos nocautes para Lrp4 apresentam resistência ao desenvolvimento de convulsões induzidas por PTZ ou pilocarpina, indicando um papel pró-convulsivante para a agrina. Não está claro, no entanto, se a inibição da NKA mediada por agrina ou a ativação de Lrp4 estão ligadas à facilitação da atividade convulsiva no presente (Figura 3A) ou estudos anteriores (HILGENBERG *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2016a), e, portanto, mais estudos devem abordar este ponto.

Na tentativa de observar os efeitos da agrina sobre os parâmetros neuroquímicos, como captação da glicose, liberação de glutamato, ativação da caspase-3 e potencial redox foram realizados experimentos *in vitro* em fatias de hipocampo de camundongos. Porém nesse modelo, a metodologia empregada partiu da incubação das fatias de animais controles com PTZ e posterior incubação com agrina. Esse protocolo alternativo foi testado em função da morte dos animais epiléticos crônicos e dificuldade de cortar o tecido cerebral dos animais epiléticos no vibrátomo. Porém não obtivemos resultados significantes, sendo necessário uma melhor elucidação se esse modelo de aplicação de PTZ diretamente nas fatias é capaz de reproduzir os mesmos efeitos vistos na epilepsia induzida pela pilocarpina.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que a incubação de fatias hipocâmpais de animais epiléticos com DRSSAb foi capaz de reestabelecer os níveis normais de glicose e glutamato, sem interferir na viabilidade das fatias. Além disso, a administração intrahipocâmpal do anticorpo DRSSAb em camundongos, demonstrou ter efeitos benéficos sobre o comportamento dos animais, por aumentar o número de cruzamentos no teste de campo aberto, porém sem possíveis efeitos antidepressivos, pois não alterou os resultados frente ao *splash* teste.

Ao investigar a expressão da agrina e neurotripsina no hipocampo de camundongos, observou-se que a agrina apresenta mudanças na sua expressão após o SE induzido por pilocarpina, porém essas mudanças não são acompanhadas por alterações na expressão da neurotripsina. E, injeções intrahipocâmpais de agrina aumentam a susceptibilidade em animais epiléticos, uma vez que há diminuição na latência para as crises mioclônicas frente ao desafio com PTZ de animais SE, sem ter influência na susceptibilidade de animais saudáveis.

Sendo assim, nossos achados apontam para importantes alvos, onde a agrina parece estar associada com a regulação da excitabilidade neuronal após SE, embora os mecanismos não necessariamente incluam a modulação da NKA. Por outro lado, o anticorpo DRSSAb, ao ativar a NKA, reestabelece algumas funções a níveis normais em fatias hipocâmpais de animais epiléticos. Além disso, os estudos do grupo em relação a agrina continuam, com o uso de um anticorpo capaz de inibir a agrina e a avaliação se há uma reversão da susceptibilidade as crises convulsivas. Buscando esclarecer os mecanismos de ação da agrina, e estabelecer quais os benefícios de um possível tratamento através da inibição dessa via.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v. 32, n. 1, p. 1-14, Oct 2000. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975906> >.

ANDRE, V. et al. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. **Eur J Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 2094-106, Jun 1998. ISSN 0953816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753096> >.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med**, v. 261, n. 1, p. 44-52, Jan 2007a. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222167> >.

_____. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of internal medicine**, v. 261, n. 1, p. 44-52, Jan 2007b. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222167> >.

_____. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺ - adenosine triphosphatase. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 23, n. 8, p. 1283-90, Aug 2012. ISSN 1533-3450 (Electronic)

1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745476> >.

ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 10, p. 1133-45, Oct 2001. ISSN 0271-678X (Print)

0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598490> >.

BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D.; ALLEN HAUSER, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. **Epilepsy Res**, v. 85, n. 1, p. 31-45, Jul 2009. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369037> >.

BANERJEE, P. N.; HAUSER, W. A. Incidence and prevalence. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. **Editora Lippincott Williams & Wilkins**, v. 2^a Ed., 2007.

BEGUIN, P. et al. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. **The EMBO journal**, v. 16, n. 14, p. 4250-60, Jul 16 1997. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250668> >.

BEN-MENACHEM, E. et al. General Treatment Considerations. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. **Editora Lippincott Williams & Wilkins**, v. 2^a Ed., 2007.

BENARROCH, E. E. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 287-93, Jan 18 2011. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242497> >.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795> >.

BERG, A. T.; MILLICHAP, J. J. The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. **Continuum (Minneapolis, Minn)**, v. 19, n. 3 Epilepsy, p. 571-97, Jun 2013. ISSN 1538-6899 (Electronic) 1080-2371 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739099> >.

BERG, A. T.; SHINNAR, S. The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: a quantitative review. **Neurology**, v. 41, n. 7, p. 965-72, Jul 1991. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2067659> >.

BERZIN, T. M. et al. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 2, p. 349-55, Mar-Apr 2000. ISSN 0197-4580 (Print) 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867220> >.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 68-82, Jan 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043029> >.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. F633-50, Nov 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815123> >.

BOLING, W. W. et al. Fluorodeoxyglucose-positron emission tomographic imaging for the diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurosurgery**, v. 63, n. 6, p. 1130-8; discussion 1138, Dec 2008. ISSN 1524-4040 (Electronic) 0148-396X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057325> >.

BOSE, C. M. et al. Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9086-95, Dec 15 2000. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124985> >.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 1.161, de 7 de julho de 2005. . 2005. Disponível em: < http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Portaria_1161.pdf >. Acesso em: 25 de janeiro de 2016.

BUCKMASTER, P. S.; LEW, F. H. Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 233747, Feb 9 2011. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307269> >.

CAMERON, R. et al. Neurons and astroglia express distinct subsets of NaK-ATPase a and b subunits. **Mol. Brain Res.**, v. 21, p. 333-343, 1994.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, Nov-Dec 1991. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743148> >.

CAVUS, I. et al. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. **Annals of neurology**, v. 57, n. 2, p. 226-35, Feb 2005. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668975> >.

CHEN, S.; BUCKMASTER, P. S. Stereological analysis of forebrain regions in kainate-treated epileptic rats. **Brain research**, v. 1057, n. 1-2, p. 141-52, Sep 28 2005. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16122711> >.

CLAPCOTE, S. J. et al. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 14085-90, Aug 18 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666602> >.

CLAUSEN, M. V.; HILBERS, F.; POULSEN, H. The Structure and Function of the Na,KATPase Isoforms in Health and Disease. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 371, 2017. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28634454> >.

COHEN, N. A. et al. Expression of agrin in the developing and adult rat brain. **Neuroscience**, v. 76, n. 2, p. 581-96, Jan 1997. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015340> >.

COTMAN, S. L.; HALFTER, W.; COLE, G. J. Agrin binds to beta-amyloid (Abeta), accelerates abeta fibril formation, and is localized to Abeta deposits in Alzheimer's disease brain. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 15, n. 2, p. 183-98, Feb 2000. ISSN 10447431 (Print) 1044-7431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673326> >.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 4909, Sep 29 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345722> >.

CUI, J. G.; BAZAN, N. G. Agrin downregulation induced by nerve injury contributes to neuropathic pain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 15286-97, Nov 10 2010. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068333> >.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436> >.

DE BOER, H. M.; MULA, M.; SANDER, J. W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 4, p. 540-6, May 2008. ISSN 1525-5050 (Print)

1525-5050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280210> >.

DETOMASO, A. W. et al. Expression, targeting, and assembly of functional Na,K-ATPase polypeptides in baculovirus-infected insect cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1470-8, Jan 15 1993. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380413> >.

DICHTER, M. A. et al. Epidemiology, Pathology and Genetics of Epilepsy. Epilepsy: A Comprehensive Textbook, by Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. **Editora Lippincott Williams & Wilkins**, v. 2^a Ed., 2007.

DURING, M. J.; SPENCER, D. D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. **Lancet**, v. 341, n. 8861, p. 1607-10, Jun 26 1993. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099987> >.

DURLACHER, C. T. et al. Targeting Na(+)/K(+) -translocating adenosine triphosphatase in cancer treatment. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 42, n. 5, p. 42743, May 2015. ISSN 1440-1681 (Electronic)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739707> >.

ENGEL, J., JR. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-803, Jun 2001. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11422340> >.

FAURE, J. B. et al. Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 5, p. 644-53, May 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24621352> >.

FAUSER, S.; TUMANI, H. Chapter 15 - Epilepsy. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 146, n. 3, p. 259, 2018.

FIGHERA, M. R. et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. **Neurobiology of disease**, v. 22, n. 3, p. 611-23, Jun 2006. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516483> >.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690> >.

FISHER, R. S. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 531-542, Apr 2017. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276064> >.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939> >.

- FITZGERALD, P. B. Treatment of depression in a patient with epilepsy. **Brain Stimul**, v. 7, n. 4, p. 619-20, Jul-Aug 2014. ISSN 1935-861X (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680788> >.
- FORSGREN, L. et al. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. **Eur J Neurol**, v. 12, n. 4, p. 245-53, Apr 2005. ISSN 1351-5101 (Print) 1351-5101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804240> >.
- FUJISAWA, H. et al. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. **Japanese journal of pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 327-34, Dec 1965. ISSN 0021-5198 (Print) 0021-5198 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5296045> >.
- FUNCHAL, C.; DANI, C. Neurociências: Modelos Experimentais em Animais. 2014.
- FUNCK, V. R. et al. Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. **Neuroscience**, v. 298, p. 171-9, Jul 9 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907445> >.
- FUNCK, V. R. et al. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 10, p. 1705-10, Dec 2014. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311690> >.
- FURIAN, A. F. et al. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochemistry international**, v. 50, n. 1, p. 164-71, Jan 2007. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963161> >.
- FURTADO MDE, A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 37-9, 2002. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121293> >.
- GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. [Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, n. 4, p. 323-8, Dec 2005. ISSN 1516-4446 (Print) 1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358116> >.
- GOLARAI, G. et al. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. **J Neurosci**, v. 21, n. 21, p. 8523-37, Nov 1 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606641> >.
- GROTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LOSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Exp Neurol**, v. 207, n. 2, p. 329-49, Oct 2007. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714705> >.

GUALTIERI, F. et al. Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. **Neuroscience**, v. 218, p. 278-94, Aug 30 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609936> >.

GULLEDGE, A. T. et al. A sodium-pump-mediated afterhyperpolarization in pyramidal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 32, p. 13025-41, Aug 7 2013. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926257> >.

GUO, Y. et al. In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 972-9, Sep 15 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477240> >.

HABIBA, A.; BLANCO, G.; MERCER, R. W. Expression, activity and distribution of Na,KATPase subunits during in vitro neuronal induction. **Brain research**, v. 875, n. 1-2, p. 1-13, Sep 1 2000. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967293> >.

HAGLUND, M. M.; SCHWARTZKROIN, P. A. Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. **J Neurophysiol**, v. 63, n. 2, p. 225-39, Feb 1990. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2313342> >.

HARDEN, C. L. The co-morbidity of depression and epilepsy: epidemiology, etiology, and treatment. **Neurology**, v. 59, n. 6 Suppl 4, p. S48-55, Sep 24 2002. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270969> >.

HARDWICKE, P. M.; FREYTAG, J. W. A proteolipid associated with Na,K-ATPase is not essential for ATPase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 102, n. 1, p. 250-7, Sep 16 1981. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272791> >.

HAUSER, W. A. et al. Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures. **N Engl J Med**, v. 338, n. 7, p. 429-34, Feb 12 1998. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459646> >.

HERMANN, B.; SEIDENBERG, M.; JONES, J. The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed? **Lancet Neurol**, v. 7, n. 2, p. 151-60, Feb 2008. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207113> >.

HILGENBERG, L. G. et al. Agrin regulates neuronal responses to excitatory neurotransmitters in vitro and in vivo. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 19, n. 1, p. 97-110, Jan 2002. ISSN 1044-7431 (Print) 1044-7431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11817901> >.

HILGENBERG, L. G. et al. Alpha₃Na⁺/K⁺-ATPase is a neuronal receptor for agrin. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 359-69, Apr 21 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630822> >.

HOLM, T. H. et al. Cognitive deficits caused by a disease-mutation in the alpha3 Na(+)/K(+)-ATPase isoform. **Scientific reports**, v. 6, p. 31972, Aug 23 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27549929> >.

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10404, Apr 28 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436931> >.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-7, Dec 29 1995. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742483> >.

JONES, D. H.; DAVIES, T. C.; KIDDER, G. M. Embryonic expression of the putative gamma subunit of the sodium pump is required for acquisition of fluid transport capacity during mouse blastocyst development. **The Journal of cell biology**, v. 139, n. 6, p. 1545-52, Dec 15 1997. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396759> >.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual review of physiology**, v. 65, p. 817-49, 2003. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524462> >.

JURKAT-ROTT, K. et al. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. **Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1857-61, May 25 2004. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159495> >.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 72, n. 11, p. 1029-42, Nov 2013. ISSN 1554-6578 (Electronic) 0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24128677> >.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Microtubule-associated proteins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with granular cell layer dispersion. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 960126, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069608> >.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 51135, 2002. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045105> >.

KHORSHIDI, Z. CANONICAL AND NONCANONICAL TRANSDUCERS FOR CALCIUM SIGNALING: Role of Na,K-ATPase and angiotensin receptor. **Thesis of Department of Women's and Children's Health Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden**, 2013.

- KNOPP, A. et al. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Comp Neurol**, v. 483, n. 4, p. 476-88, Mar 21 2005. ISSN 00219967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700275> >.
- KRISHNAMOORTHY, E. S. Treatment of depression in patients with epilepsy: problems, pitfalls, and some solutions. **Epilepsy Behav**, v. 4 Suppl 3, p. S46-54, Oct 2003. ISSN 15255050 (Print) 1525-5050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592640> >.
- KROGER, S.; SCHRODER, J. E. Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 17, p. 207-12, Oct 2002. ISSN 0886-1714 (Print) 0886-1714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270958> >.
- KWAN, P.; SANDER, J. W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75, n. 10, p. 1376-81, Oct 2004. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377680> >.
- LAMUSUO, S. et al. [18F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage. **Archives of neurology**, v. 58, n. 6, p. 933-9, Jun 2001. ISSN 00039942 (Print) 0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11405808> >.
- LAXER, K. D. et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy Behav**, v. 37, p. 59-70, Aug 2014. ISSN 1525-5069 (Electronic) 1525-5050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980390> >.
- LEE, D. I. et al. Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase modulates cardiac L-type Ca²⁺ channel function. **Molecular pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 774-81, Apr 2009. ISSN 1521-0111 (Electronic) 0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122004> >.
- LEES, G. J. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 120, n. 2, p. 159-62, Dec 11 1990. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705675> >.
- LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 93-103, Jun 2002. ISSN 09201211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151121> >.
- LEITE, J. P. et al. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 8, p. 681-3, 1990. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2101094> >.

LI, S.; STYS, P. K. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 675-83, 2001. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720790> >.

LOSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur J Pharmacol**, v. 342, n. 1, p. 1-13, Jan 19 1998. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544786> >.

_____. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, Jun 2011. ISSN 1532-2688 (Electronic) 1059-1311 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292505> >.

LOTHMAN, E. W.; BERTRAM, E. H., 3RD. Epileptogenic effects of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 34 Suppl 1, p. S59-70, 1993. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8462492> >.

MAGILL, C. et al. Agrin. **Progress in brain research**, v. 71, p. 391-6, 1987. ISSN 00796123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3035610> >.

MALIK, N. et al. Structural organization and chromosomal localization of the human Na,KATPase beta 3 subunit gene and pseudogene. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 9, n. 2, p. 136-43, Feb 1998. ISSN 0938-8990 (Print) 0938-8990 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457675> >.

MARQUEZAN, B. P. et al. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na(+),K(+)-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy Res**, v. 105, n. 3, p. 396-400, Aug 2013. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602551> >.

MATHERN, G. W. et al. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 237-51, 2002. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12143344> >.

MBUBA, C. K. et al. The epilepsy treatment gap in developing countries: a systematic review of the magnitude, causes, and intervention strategies. **Epilepsia**, v. 49, n. 9, p. 1491-503, Sep 2008. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18557778> >.

MCGRAIL, K. M.; PHILLIPS, J. M.; SWEADNER, K. J. Immunofluorescent localization of three NaK-ATPase isozymes in the rat central nervous system: Both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. **J. Neurosci**, v. 11, p. 381-391, 1991.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 616-26, Jan 17 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234593> >.

MOSHE, S. L. et al. Epilepsy: new advances. **Lancet**, v. 385, n. 9971, p. 884-98, Mar 7 2015. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260236> >.

MUDO, G. et al. Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. **Epilepsia**, v. 37, n. 2, p. 198-207, Feb 1996. ISSN 0013-9580 (Print)
0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635431> >.

MURRAY, C. J. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197-223, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245608> >.

NGUGI, A. K. et al. Premature mortality in active convulsive epilepsy in rural Kenya: causes and associated factors. **Neurology**, v. 82, n. 7, p. 582-9, Feb 18 2014. ISSN 1526-632X (Electronic)
0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443454> >.

NISHI, A. et al. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1492-501, Oct 1999. ISSN 00223042 (Print)
0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501194> >.

O'CONNOR, L. T. et al. Expression of agrin mRNA is altered following seizures in adult rat brain. **Brain research. Molecular brain research**, v. 33, n. 2, p. 277-87, Nov 1995. ISSN 0169-328X (Print)
0169-328X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8750887> >.

OMS. Global burden of epilepsy and the need for coordinated action at the country level to address its health, social and public knowledge implications. 2015. Disponível em: < <http://www.epilepsia.pt/pt/articles/oms-epilepsia-e-prioridade-mundial> >. Acesso em: 25 de janeiro de 2016.

PAULI, E. et al. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. **Neurology**, v. 67, n. 8, p. 1383-9, Oct 24 2006. ISSN 1526632X (Electronic)
0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060564> >.

PETROFF, O. A. et al. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. **Epilepsia**, v. 43, n. 7, p. 703-10, Jul 2002. ISSN 0013-9580 (Print)
0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102672> >.

POULSEN, H. et al. Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. **Nature**, v. 467, n. 7311, p. 99-102, Sep 2 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720542> >.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700> >.

RAO, V. R.; LOWENSTEIN, D. H. Epilepsy. **Curr Biol**, v. 25, n. 17, p. R742-6, Aug 31 2015. ISSN 1879-0445 (Electronic) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26325130> >.

RAPPORT, R. L., 2ND et al. Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. **Archives of neurology**, v. 32, n. 8, p. 549-54, Aug 1975. ISSN 0003-9942 (Print) 0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/125576> >.

REIF, R. et al. Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. **FASEB J**, v. 21, n. 13, p. 3468-78, Nov 2007a. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586728> >. _____.
Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 13, p. 3468-78, Nov 2007b. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586728> >.

REINHARD, L. et al. Na(+),K (+)-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na(+),K (+)-ATPase. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 70, n. 2, p. 20522, Jan 2013. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695678> >.

ROGAWSKI, M. A. The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 54 Suppl 2, p. 33-40, May 2013. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23646969> >.

ROGAWSKI, M. A.; BAZIL, C. W. New molecular targets for antiepileptic drugs: alpha(2)delta, SV2A, and K(v)7/KCNQ/M potassium channels. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 8, n. 4, p. 345-52, Jul 2008. ISSN 1534-6293 (Electronic) 1528-4042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590620> >.

ROGAWSKI, M. A.; LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 553-64, Jul 2004. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208697> >.

ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8143-55, Jun 24 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553454> >.

RUPP, F. et al. Agrin and the organization of the neuromuscular junction. **Current opinion in neurobiology**, v. 2, n. 1, p. 88-93, Feb 1992. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322209> >.

- SADZOT, B. et al. Regional brain glucose metabolism in patients with complex partial seizures investigated by intracranial EEG. **Epilepsy research**, v. 12, n. 2, p. 121-9, Jul 1992. ISSN 09201211 (Print)
0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396538> >.
- SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-70, Apr 2003. ISSN 1350-7540 (Print)
1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644744> >.
- SCHWINGER, R. H. et al. The Na, K-ATPase in the failing human heart. **Cardiovascular research**, v. 57, n. 4, p. 913-20, Mar 15 2003. ISSN 0008-6363 (Print)
0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650869> >.
- SERPINSKAYA, A. S. et al. Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. **Developmental biology**, v. 205, n. 1, p. 65-78, Jan 1 1999. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882498> >.
- SHARMA, A. K. et al. Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 7, p. 932-43, Dec 2008. ISSN 1533-1601 (Electronic)
0192-6233 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126789> >.
- SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 249-61, Jun 1992. ISSN 0145-479X (Print)
0145-479X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328174> >.
- SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-7, Jan 2007. ISSN 1933-7213 (Print)
1878-7479 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199014> >.
- STEINER, E. et al. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. **Glia**, v. 60, n. 11, p. 1646-59, Nov 2012. ISSN 1098-1136 (Electronic)
0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782669> >.
- STEPHAN, A. et al. Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 6, p. 1861-73, Jun 2008. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230682> >.
- SUN, X. D. et al. Lrp4 in astrocytes modulates glutamatergic transmission. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 1010-8, Aug 2016a. ISSN 1546-1726 (Electronic)
1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294513> >.
- _____. Lrp4 in astrocytes modulates glutamatergic transmission. **Nat Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 1010-8, Aug 2016b. ISSN 1546-1726 (Electronic)
1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294513> >.
- TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 829-34, Jun 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828683> >.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 279, n. 3, p. C541-66, Sep 2000. ISSN 0363-6143 (Print) 0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942705> >.

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515-23, Oct 2015. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336950> >.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639740> >.

VAGUE, P. et al. C-peptide, Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, and diabetes. **Experimental diabetes research**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan-Mar 2004. ISSN 1543-8600 (Print) 1543-8600 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198370> >.

VARGAS-SANCHEZ, K. et al. Astroglial role in the pathophysiology of status epilepticus: an overview. **Oncotarget**, v. 9, n. 42, p. 26954-26976, Jun 1 2018. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928494> >.

VERBEEK, M. M. et al. Distribution of A beta-associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 96, n. 6, p. 628-36, Dec 1998. ISSN 00016322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845293> >.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 3140, Jan 2011. ISSN 1759-4766 (Electronic) 1759-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135885> >.

WHAYNE, T. F., JR. Clinical Use of Digitalis: A State of the Art Review. **American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions**, Jul 31 2018. ISSN 1179187X (Electronic) 1175-3277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30066080> >.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Neurological Disorders: Public Health Challenges, WHO. 2006. 2006.

WIESER, H. G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, Jun 2004. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144438> >.

WILLIS, S. et al. Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. **Neurobiol Dis**, v. 40, n. 3, p. 565-72, Dec 2010. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691264> >.

WILMSHURST, J. M.; BIRBECK, G. L.; NEWTON, C. R. Epilepsy is ubiquitous, but more devastating in the poorer regions of the world... or is it? **Epilepsia**, v. 55, n. 9, p. 1322-5, Sep 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092214> >.

WOZNY, C. et al. Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". **Science**, v. 301, n. 5632, p. 463; author reply 463, Jul 25 2003. ISSN 10959203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881553> >.

XU, K. Y. Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 4, p. 1669-77, Dec 30 2005. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263081> >.

XU, K. Y.; TAKIMOTO, E.; FEDARKO, N. S. Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase induces positive inotropy in intact mouse heart in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 349, n. 2, p. 582-7, Oct 20 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949050> >.

YUEN, E. S.; TROCONIZ, I. F. Can pentylenetetrazole and maximal electroshock rodent seizure models quantitatively predict antiepileptic efficacy in humans? **Seizure**, v. 24, p. 21-7, Jan 2015. ISSN 1532-2688 (Electronic) 1059-1311 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564315> >.

ZHANG, L. et al. FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **International journal of medical sciences**, v. 12, n. 3, p. 288-94, 2015. ISSN 1449-1907 (Electronic) 1449-1907 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798055> >.

ZHENG, J. et al. Cardioprotection induced by Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Cardiovascular research**, v. 89, n. 1, p. 51-9, Jan 1 2011. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724308> >.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Consequências funcionais da modulação da Na⁺,K⁺-ATPase com anticorpo DRRSAb ou Agrina na epilepsia experimental induzida por pilocarpina", protocolada sob o CEUA nº 6262060616, sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira e equipe; Ana Claudia Beck Grauncke; Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Fernanda Kulinski Mello; Mayara Lutchemeyer de Freitas; Thaíze Lopes de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 11/08/2016.

We certify that the proposal "Functional consequences of Na⁺,K⁺-ATPase modulation with DRRSAb antibodies or Agrin in the pilocarpine-induced experimental epilepsy", utilizing 300 Isogenic mice (300 males), protocol number CEUA 6262060616, under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira and team; Ana Claudia Beck Grauncke; Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Fernanda Kulinski Mello; Mayara Lutchemeyer de Freitas; Thaíze Lopes de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 08/11/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **12/2018**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **20 a 30 dias**

N: **300**

Linagem: **C57BL/6**

Peso: **10 a 15 g**

Resumo: A epilepsia é uma condição neurológica crônica com incidência de 1-2 % na população em geral. A principal e mais marcante característica da epilepsia é a ocorrência de crises epiléticas, definidas como alterações comportamentais e/ou motoras resultantes de descargas paroxismais excessivas e sincrônicas de grupos de neurônios no encéfalo, e que acarretam enorme prejuízo à qualidade de vida dos pacientes afetados e suas famílias. Enquanto a monoterapia com anticonvulsivantes promove o controle das crises em 60-70 % dos pacientes, as crises permanecem não-controláveis em um número significativo de indivíduos, mesmo com o uso de várias drogas e diferentes esquemas de tratamento. Além disso, a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia é afetada negativamente por diversas co-morbidades neurológicas de difícil tratamento, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e déficits cognitivos. Assim, o entendimento das bases moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de epilepsia e co-morbidades associadas é de fundamental importância para a concepção de estratégias terapêuticas eficazes para prevenção da epilepsia ou modificação da doença. Nesse contexto, o presente projeto de pesquisa pretende elucidar o potencial da Na⁺,K⁺-ATPase como novo alvo terapêutico para desenvolvimento de drogas anticonvulsivantes e para o tratamento de co-morbidades da epilepsia, utilizando abordagem metodológica que inclui técnicas farmacológicas, bioquímicas e comportamentais. A Na⁺,K⁺-ATPase constitui um possível alvo para o desenvolvimento de tais drogas pois contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores, e modula diretamente a excitabilidade e diversas vias de sinalização celular. Além disso, nos últimos anos foram descobertas proteínas capazes de interagir fisicamente com a Na⁺,K⁺-ATPase e modular diretamente sua atividade. Entre essas proteínas está a agrina, que causa inibição da Na⁺,K⁺-ATPase. O conhecimento do papel regulador da agrina sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, tem levado ao desenvolvimento de estratégias farmacológicas inovadoras para tratamento da dor neuropática e comportamento típico de mania em camundongos condições em que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está diminuída e pode ser restaurada com antagonistas da agrina. Contudo, o potencial destes antagonistas da agrina para uso na epilepsia e comorbidades associadas permanece desconhecido. Nesse contexto, a realização do presente projeto contribuirá para elucidar os mecanismos responsáveis pela desregulação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase na epilepsia do lobo temporal e para identificar estratégias farmacológicas eficazes para o tratamento da refratariedade aos anticonvulsivantes atualmente disponíveis e para o tratamento de co-morbidades da epilepsia como a depressão, ansiedade e déficits cognitivos. Além disso, desde que a epilepsia tem sido considerada de longa data [uma janela para os mecanismos cerebrais], o presente estudo também pode contribuir para o entendimento da regulação da Na⁺,K⁺-ATPase em situações fisiológicas.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, prédio 21, salas 5214 e 5219



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

Santa Maria, 06 de agosto de 2018

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

03/08/2018 Homepage

Experimental Neurology Mauro Oliveira | My Journals | Log Out | Help

Home Reports

My Author Tasks

[Start New Submission](#) [Click here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

<p>Agrin facilitates provoked seizures after pilocarpine-induced status epilepticus in mice</p> <p>Current status: With Journal (03/Aug/2018)</p>	<p>YEXNR_2018_73</p> <p>Article Type: Research Paper</p> <p>Initial submission : 03/Aug/2018</p>
---	--

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Terms of Use](#) | [Privacy Policy](#) | [About Us](#)

https://www.evise.com/evise/faces/pages/homepage/homepage.jspx?_adf.ctrl-state=rp75say9f_278 1/1

ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DE REPRODUÇÃO DO ARTIGO PUBLICADO

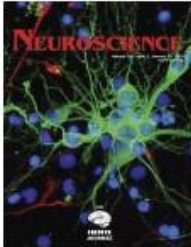


RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Na⁺, K⁺-ATPase Activating Antibody Displays in vitro and in vivo Beneficial Effects in the Pilocarpine Model of Epilepsy

Author: Mayara Lütchemeyer de Freitas, Clarissa Vasconcelos de Oliveira, Fernanda Kulinski Mello, Vinícius Rafael Funck, Michele Rechia Figuera, Luiz Fernando Freire Royes, Ana Flávia Furian, James W. Larrick, Mauro Schneider Oliveira

Publication: Neuroscience

Publisher: Elsevier

Date: 1 May 2018

© 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

LOGIN

If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a [RightsLink](#) user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2018 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com