



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

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CysLT1 NAS
CRISES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM
CAMUNDONGOS, NA PERMEABILIDADE DA
BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E NA
MODULAÇÃO DA ENZIMA NA⁺,K⁺-ATPASE EM
HIPOCAMPO.**

TESE DE DOUTORADO

Quéli Fernandes Lenz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CysLT1 NAS CRISES
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM
CAMUNDONGOS, NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA E NA MODULAÇÃO DA ENZIMA
NA₊,K₊-ATPASE EM HIPOCAMPO.**

Quéli Fernandes Lenz

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lenz, Quéli Fernandes

Envolvimento dos receptores CysLT1 nas crises induzidas por pentilenotetrazol em camundongos, na permeabilidade da barreira hematoencefálica e na modulação da enzima Na^+,K^+ -ATPASE em hipocampo. / Quéli Fernandes Lenz.-2014.

133 p.; 30cm

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Receptores CysLT1 2. Leucotrienos 3. Epilepsia 4. Barreira hematoencefálica 5. Na^+,K^+ -ATPase I. Mello, Carlos Fernando de II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Quéli Fernandes Lenz. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: qflenz@hotmail.com

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

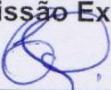
**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CysLT1 NAS CRISES
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS,
NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
NA MODULAÇÃO DA ENZIMA NA⁺,K⁺-ATPASE EM HIPOCAMPO**

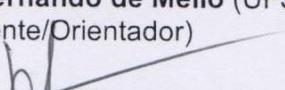
elaborada por

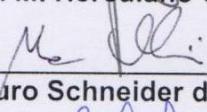
Quéli Fernandes Lenz

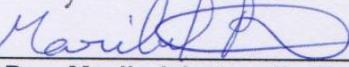
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

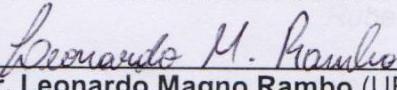
Comissão Examinadora


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


Prof. Dr. Anderson M. Herculano Oliveira da Silva (UFPA)


Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira (UFSM)


Prof. Dra. Maribel Antonello Rubin (UFSM)


Dr. Leonardo Magno Rambo (UFSM)

Santa Maria, 2014

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rubem e Ilca, ao meu esposo Dalton,
e à minha maior fonte de luz, minha filha Manuela.
Sem eles eu não teria chegado até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Ser Supremo, que sempre esteve comigo durante toda a jornada, por toda a força que me concedeu, por estar sempre presente e, principalmente, por levantar-me quando, muitas vezes, tropecei, agradeço por mais esta vitória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello, o meu reconhecimento e gratidão pela oportunidade e pelas horas que dedicou ao meu trabalho.

Aos meus pais, Rubem e Ilca, pessoas extremamente humanas e sensíveis, seres dotados de luz própria, conselheiros e orientadores, meus heróis e meus ídolos, amigos sempre presentes e insubstituíveis que abriram mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, a quem devo minha vida e cada conquista adquirida, agradeço por mais esta vitória.

Aos meus irmãos, Helen e Allan, agradeço por existirem, agradeço pelos sorrisos, pelas brincadeiras, pelas caras lindas, pelos beijos, pelos abraços, mesmo sem saber que o faziam, vocês souberam me acalentar. Vocês dão sentido maior a minha vida.

À minha irmã Iomar, minha “Dada”, sempre presente, agradeço por tudo que fez e ainda faz. Você é parte de mim.

Ao meu esposo Dalton, meu amor, que soube suportar meus piores momentos, acalmar meus piores medos e me fazer sossegar quando a tensão parecia insuportável, agradeço pela compreensão, pelo carinho e pelo apoio dedicados. Sem ele, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu amor maior, minha filha Manuela, maior presente que o doutorado me trouxe, agradeço pela luz que emana, pelo sorriso que me alenta, pela garra que me confere.

Aos meus avós, Branca e Olímpio, que, “literalmente”, viveram a minha vida comigo, cada medo, cada sonho, cada conquista, agradeço por toda a força e dedicação.

À minha amiga Fernanda, colega e companheira, que me deu todo o apoio e carinho possíveis e que, muitas vezes, foi mãe, irmã, parceira, agradeço pelas horas que,

incansavelmente, esteve comigo, nas horas de riso e nas horas de choro, nas horas de tensão e também nas de satisfação. Você é peça fundamental deste trabalho e da minha vida. Eu não teria conseguido sem você.

A toda equipe do Labneuro, aos que ainda permanecem na equipe e também aos já estão em outros caminhos: Josi, Aline, Ana, Laura, Amanda, Lígia, Ju, Léo, Rafa, Cíntia, Alice, Cris, Mile, Letícia, Mauren, Dani, Seu Florindo, etc. agradeço por toda a ajuda e por terem feito meus dias de pesquisa ainda mais felizes.

Agradeço à Zeli, nossa querida secretária do PPG Farmacologia, por estar sempre disposta a ajudar, com sorriso no rosto e coração aberto. Agradeço por todos os contratempos que me ajudou a resolver.

Agradeço à CAPES e à Universidade Federal de Santa Maria por ter me concedido uma bolsa de estudos, tornando possível a realização deste sonho.

A todas aquelas pessoas que, de uma forma ou de outra, estiveram comigo durante esta jornada o meu eterno agradecimento.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço aos animais, cujas vidas foram sacrificadas em prol do desenvolvimento da ciência.

*“Se, a princípio, a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela.”*

Albert Einstein

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CysLT1 NAS CRISES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS, NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E NA MODULAÇÃO DA ENZIMA Na⁺,K⁺-ATPASE EM HIPOCAMPO.

Autor(a): Quéli Fernandes Lenz
Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Local e data da defesa: 23 de agosto de 2014, UFSM.

Evidências crescentes têm mostrado que os leucotrienos são importantes contribuintes na patofisiologia de diversas doenças inflamatórias do sistema nervoso central nas quais a excitotoxicidade esteja envolvida, incluindo trauma crânio-encefálico, encefalite, doença de Parkinson, isquemia, dor neuropática e epilepsia. Entretanto pouco se sabe sobre o mecanismo molecular pelo qual os leucotrienos facilitam a atividade excitatória no encéfalo. Assim, neste trabalho investigamos o efeito de antagonistas para receptores de leucotrienos cisteínicos (CysLT) sobre as convulsões induzidas por PTZ em camundongos. Bay-u9973 (3 and 30 nmol), montelucaste (0.03 and 0.3 µmol) e pranlucaste (1 and 3 µmol), aumentaram a latência para as crises e diminuíram a amplitude média do EEG durante as crises. Montelucaste (0.03 and 0.3 µmol) previneu a ruptura da BHE induzida pelo PTZ, e o efeito foi revertido pelo LTD4 (6 pmol). Além disso, as doses de LTD4 (0.2 and 2 pmol) que revertem o efeito do montelucaste nas crises não alteraram o efeito protetor do montelucaste sobre a barreira, dissociando o efeito anticonvulsivante do efeito protetor sobre a BHE. As análises de microscopia confocal revelaram: 1) PTZ aumentou o número de células CD45+ e IgG no córtex, evidenciando a ruptura da BHE; 2) enquanto o LTD4 (6 pmol) potencializou, o montelucaste diminuiu o efeito do PTZ sobre a migração leucocitária. Considerando que níveis aumentados de leucotrienos e diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase são achados comuns em diversas condições excitotóxicas, incluindo crises epilépticas, também investigamos o efeito do LTD4 sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos. LTD4 nas doses de 10 e 100 nM, diminuiu a atividade das subunidades alfa 2/3 e alfa 1, respectivamente. O efeito inibitório do LTD4 na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase não foi reproduzido quando realizado com homogeneizado de hipocampo, indicando que esse efeito requer a célula intacta. A fim de nos certificarmos de que o LTD4 (10 nM) estava se ligando ao receptor CysLT1, incubamos as fatias com anticorpo anti-CysLT1, e verificamos que, na presença do anticorpo, o LTD4 perde o efeito. Além disso, observamos que a diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida pelo LTD4 foi revertida pelo montelucaste (1 µM), agonista inverso dos receptores CysLT1. Neste trabalho mostramos ainda que a ativação da PKC possivelmente esteja envolvida no efeito do LTD4 sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos, uma vez que o GF 109203X (0,3 µM), inibidor da PKC, previneu esse efeito. Por fim, mas não menos importante, também demonstramos que em animais injetados i.c.v. com LTD4 (2 pmol/3 µL, i.c.v.), também ocorre uma diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, corroborando com nossos achados *in vitro* e confirmado a importância biológica deste trabalho. Assim, este trabalho mostrou evidências do envolvimento dos receptores CysLT1 nas crises induzidas por PTZ bem como na permeabilidade da BHE, sendo a modulação da enzima Na⁺,K⁺-ATPase um possível mecanismo para a implicação dos leucotrienos em diversas doenças do SNC relacionadas com inflamação e hiperexcitabilidade.

Palavras-chave: Receptores CysLT1. Leucotrienos. Epilepsia. Barreira hematoencefálica. Na⁺,K⁺-ATPase.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis
Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

CysLT1 RECEPTOR INVOLVEMENT IN PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED SEIZURE IN MICE, ON BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY AND HIPPOCAMPAL NA₊,K₊-ATPASE ENZYME MODULATION.

Author(a): Quéli Fernandes Lenz
Advisor: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Date and place of the Defense: 23th, august of 2014, UFSM.

Growing evidence has shown that leukotrienes are important contributors in the pathophysiology of several SNC inflammatory diseases where excitotoxicity is involved, including traumatic brain injury, encephalitis, Parkinson's disease, ischemia, epilepsy and neuropathic pain. However little is known about the molecular mechanism by which leukotrienes facilitate excitatory activity in the brain. Thus, in this study we investigated the effect of antagonists for cysteinyl leukotrienes receptors (CysLT) on PTZ-induced seizure in mice. Bay-u9973 (3 and 30 nmol), montelukast (0.03 and 0.3 µmol) and pranlukast (1 and 3 µmol), increased the latency to generalized seizures and decreased the mean amplitude of EEG recordings during seizures. LTD4 (0.2 and 2 pmol) reverted the anticonvulsant effect of montelukast (0.3 µmol). Montelukast (0.03 and 0.3 µmol) prevented PTZ-induced BBB disruption, an effect that was reversed by LTD4 (6 pmol). In addition, doses of LTD4 (0.2 and 2 pmol) which reversed the effect of montelukast in crisis did not alter the protective effect of montelukast on the barrier, dissociating the anticonvulsant of protective effect on BBB. The confocal microscopy analysis revealed that 1. PTZ increased the number of CD45+ and IgG cells in cerebral cortex, indicating BBB leakage with leukocyte infiltration; 2. while LTD4 (6 pmol) potentiated, montelukast decreased the effect of PTZ on leukocyte migration. Considering that increase levels of leukotrienes and decrease in Na₊,K₊-ATPase are common findings in several excitotoxic conditions, including epileptic seizures, we also investigated the effects of LTD4 on the activity of Na₊,K₊-ATPase activity in mice hippocampal slices. LTD4 10 and 100 nM decreases Na₊,K₊-ATPase activity alpha 2, 3 and alpha 1 subunits, respectively, in mice hippocampal slices. The inhibitory effect of LTD4 on Na₊,K₊-ATPase activity was not observed in hippocampal homogenates, indicating that it requires intact cells. Moreover, we showed that LTD4-induced decrease Na₊,K₊-ATPase activity was reversed by CysLT1R inverse agonist, montelukast (1 µM). In addition, we also showed that possibly the PKC activation pathway is involved in LTD4-induced decrease of Na₊,K₊-ATPase activity in mice hippocampal slices, since PKC inhibitor, GF 109203X (0,3 µM), prevent this effect. Finally, but not least important, we have demonstrated that animals injected with LTD4 (2 pmol/3 µL icv), there also occurs a decrease in Na₊,K₊-ATPase activity, corroborating our *in vitro* findings and confirming the biological importance of this work. In summary, we showed that CysLT1 receptor activation modulates hippocampal Na₊,K₊-ATPase activity in mice, suggesting a possible mechanism for the involvement of leukotrienes in several disorders related with brain inflammation and hyperexcitability.

Key words: CysLT1 receptors. Leukotrienes. Epilepsy. Blood-brain barrier. Na₊,K₊-ATPase.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura química do ácido araquidônico (AA) | 29 |
| Figura 2 – Estrutura básica tridimensional das lipoxygenases..... | 30 |
| Figura 3 – Via das Lipoxygenases. | 31 |
| Figura 4 – Geração de leucotrienos, a partir do ácido araquidônico, pela ação da 5-LOX..... | 32 |
| Figura 5 – Translocação da 5-LOX e biossíntese dos leucotrienos no citoplasma. | 32 |
| Figura 6 – Biossíntese dos leucotrienos dentro do núcleo. | 33 |
| Figura 7 – Transporte dos leucotrienos para o meio extracelular..... | 34 |
| Figura 8 – Estrutura química do ácido docosaenoico (DHA)..... | 35 |
| Figura 9 – Esquema representativo da unidade neurovascular. | 39 |
| Figura 10 – Esquema representativo do complexo juncional para adesão das células endoteliais..... | 43 |
| Figura 11 – Esquema representativo das múltiplas vias que regulam a permeabilidade paracelular. | 46 |
| Figura 12 – Representação esquemática do ciclo de transporte iônico pela enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase..... | 50 |
| Figura 13 – Esquema representativo da estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase. | 51 |

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| 12-HETE | – Ácido 12-hidroxieicosatetraenoico |
| 12-LOX | – 12-lipoxigenase |
| 15-HPETE | – Ácido 15-hidroperoxieicosatetraenoico |
| 15-LOX | – 15-lipoxigenase |
| 5-HPETE | – Ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico |
| 5-LOX | – 5-lipoxigenase |
| AA | – Ácido araquidônico |
| ADP | – Adenosina difosfato |
| AINEs | – Antiinflamatórios não esteroidais |
| ATP | – Adenosina trifosfato |
| BHE | – Barreira hematoencefálica |
| BLT1 | – Receptor do tipo 1 para leucotrienos não-cisteínicos |
| BLT2 | – Receptor do tipo 2 para leucotrienos não-cisteínicos |
| CAM | – Molécula de adesão celular |
| COX-1 | – Ciclooxygenase 1 |
| COX-2 | – Ciclooxygenase 2 |
| CysLT | – Receptores para leucotrienos cisteínicos |
| CysLT(E) | – Receptores do tipo E para leucotrienos cisteínicos |
| CysLT1 | – Receptores do tipo 1 para leucotrienos cisteínicos |
| CysLT2 | – Receptores do tipo 2 para leucotrienos cisteínicos |
| DAMPs | – Padrões moleculares de reconhecimento de dano celular |
| DHA | – Ácido docosaenoico |
| eNOS | – Óxido nítrico sintase endotelial |
| FLAP | – Proteína ativadora da 5-LOX |
| GABA | – Ácido gama-aminobutírico |
| GABA _A | – Receptor A para Ácido gama-aminobutírico |
| GABA _B | – Receptor B para Ácido gama-aminobutírico |
| Gp-P | – Glicoproteína P |
| GPR17 | – Receptores do tipo GPR17 para leucotrienos cisteínicos |
| HIV | – Vírus da imunodeficiência humana |

| | |
|------------------------|--|
| HMGB1 | – Proteína de alta mobilidade do grupo 1 |
| i.c.v. | – intracerebroventricular |
| i.p. | – intraperitoneal |
| ICAM-1 | – Molécula de adesão intercelular do tipo 1 |
| IgG | – Imunoglobulina G |
| IL-1 β | – Interleucina 1 β |
| ILAE | – Liga Internacional Contra Epilepsia |
| LPS | – lipopolissacarídeo |
| LT | – leucotrienos |
| MAGUK | – Proteínas gualinato quinases associadas à membrana |
| MAPK | – Proteínas quinases ativadas por mitógeno |
| NDGA | – Ácido nordihidroguaiaiarético |
| NMDA | – N-metil-D-aspartato |
| PAMPs | – Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos |
| PG | – Prostaglandinas |
| PGE ₂ | – Protaglandina E ₂ |
| Pi | – Fosfato inorgânico |
| PKA | – Proteína quinase A |
| PKC | – Proteína quinase C |
| PLA ₂ | – Fosfolipase A ₂ |
| PLA ₂ C | – Fosfolipase A ₂ citosólica |
| PIsEtnPLA ₂ | – Fosfolipase A ₂ plasmalogênio-seletiva |
| PTZ | – Pentilenotetrazol |
| SE | – <i>Status Epilepticus</i> |
| SNC | – Sistema Nervoso Central |
| SRLA | – Substância lenta da anafilaxia |
| TGF- β | – Fator transformante de crescimento β |
| TLE | – Epilepsia do lobo temporal |
| TLR | – Receptores tipo <i>Toll</i> |
| TLR4 | – Receptores tipo <i>Toll</i> 4 |
| TNF- α | – Fator de necrose tumoral α |
| VEGF | – Fator de crescimento do endotélio vascular |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 Epilepsia..... | 21 |
| 1.1.1 Modelo experimental de crise induzida por pentilenotetrazol (PTZ) | 23 |
| 1.1.2 Epilepsia e inflamação..... | 25 |
| 1.1.3 Lipoxigenases e leucotrienos | 29 |
| 1.1.3.1 Lipoxigenases | 30 |
| 1.1.3.1.1 5-Lipoxigenase (5-LOX) | 31 |
| 1.1.3.1.2 Geração de leucotrienos a partir da 5-LOX | 33 |
| 1.1.3.1.3 Degradção dos leucotrienos | 34 |
| 1.1.3.1.4 Efeitos fisiopatológicos dos leucotrienos | 36 |
| 1.1.3.1.5 Receptores para leucotrienos cisteínicos | 37 |
| 1.1.4 Barreira hematoencefálica (BHE)..... | 38 |
| 1.1.4.1 Barreira hematoencefálica e crises | 47 |
| 1.1.4.1.1 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase | 49 |
| 1.1.4.1.2 Alterações na atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase..... | 52 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 57 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 59 |
| 3.1 Objetivos específicos – Parte I..... | 59 |
| 3.1.1 Objetivos específicos – Parte II | 59 |
| 3.2 Apresentação..... | 60 |
| 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS | 61 |
| 4.1 Manuscrito I | 61 |
| 4.2 Manuscrito II | 95 |
| 5 DISCUSSÃO | 115 |
| 6 CONCLUSÕES | 119 |
| 6.1 Parte I – Manuscrito I | 119 |
| 6.2 Parte II – Manuscrito II | 119 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 121 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A história da epilepsia é, provavelmente, tão antiga quanto a da espécie humana. Os povos antigos acreditavam que as pessoas com epilepsia eram tomadas, possuídas, por maus espíritos e demônios, crença que explica a etimologia do nome *epilepsia*, do grego *epilambanein*, que significa tomar, capturar, possuir (ENGEL e PEDLEY, 2008). Tem-se notícia que, entre 400 a.C. e 200 d.C., Hipócrates, acompanhado por Arateus, Celsus e Plínio, centraram seus estudos na identificação da epilepsia como uma doença do cérebro (SHORVON, 2013). Data, portanto, dessa época a definição da condição epiléptica como de natureza clínica. Avanços significativos nessa direção se seguiram ao longo do tempo até a segunda metade do século XVIII, quando o médico suíço Samuel Auguste Tissot apontou a epilepsia como fenômeno decorrente de lesões cerebrais, como tumores, acidentes vasculares cerebrais e traumatismos, e que o estudo destas lesões seria fundamental para a compreensão da doença (ENGEL e PEDLEY, 2008; SHORVON, 2013).

No século XIX, sob a marca do positivismo, muitos avanços nas ciências biológicas foram conquistados. Estudos eminentes no campo da neurofisiologia foram consolidados, repercutindo, principalmente, na área das patologias cerebrais. Nesse contexto novas teorias sobre os mecanismos originais do desenvolvimento das crises epilépticas emergiram promovendo a base dos conceitos que envolvem hoje a epileptogênese. A partir daí, as ideias sobrenaturais acerca da origem da epilepsia finalmente foram ultrapassadas. Entre autores de relevância no século XIX que se detiveram nas investigações da epilepsia, é de considerável importância o legado do cientista inglês John Hughlings Jackson que, através de autópsias em indivíduos com epilepsia, observou profundas alterações cerebrais. Em virtude da sua contribuição no campo da ciência, Hughlings é considerado, até hoje, um dos pais da neurofisiologia (SHORVON, 2013).

Desde o século XIX, muitos autores divergem em relação ao conceito da epilepsia. No final desse século alguns deles caracterizaram-na como o nome dado à perda de consciência com ou sem crise. Em 2005, a epilepsia foi conceituada como distúrbio encefálico, caracterizado pela predisposição persistente a gerar crises epilépticas. Já em 2014, a Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE) aceitou as recomendações de cientistas para que essa designação fosse alterada e, assim, a epilepsia é hoje considerada uma doença encefálica desde atenda pelo menos um, dos seguintes critérios: a) ocorrência de duas crises não provocadas em 24h, ou mais; b) uma crise não provocada e probabilidade de ocorrência (de pelo menos 60%) de outras crises semelhantes, após duas crises não provocadas, que ocorrem ao longo de 10 anos; (3) diagnóstico de síndrome epiléptica (FISCHER et al., 2014). A epilepsia pode ser considerada curada ou resolvida em indivíduos que permaneceram livres de crises nos últimos 10 anos mesmo em tratamento farmacológico; e, por 5 anos, quando não há uso de anticonvulsivantes (FISCHER et al., 2014). A epilepsia é caracterizada pela ocorrência, sem causa aparente, de repetidas crises convulsivas. Essas crises são desencadeadas por padrões sincrônicos e excessivos de descarga anormal de um grupo de neurônios, resultando em alterações comportamentais e/ou motoras (ENGEL e PEDLEY, 2008; FISCHER et al., 2014)

Dados estatísticos mostram que essa doença afeta cerca de 1% da população humana, sendo que grande parte desses pacientes não respondem ao tratamento com os anticonvulsivantes atuais (PITKÄNEN et al., 2006). As causas são diversas e vão desde defeitos no desenvolvimento do encéfalo, o que resulta em displasias ou neurônios corticais ectópicos até o envolvimento de certas mutações genéticas, como defeitos nos canais iônicos ou distúrbios metabólicos (CREMER et al., 2009; SHORVON, 2014). As crises epilépticas podem ser classificadas em mais de 40 tipos distintos. Esta classificação é definida não só pelo tipo de manifestação, mas também por características clínicas, como padrão de recorrência, causa, idade de início dos eventos epilépticos, presença ou ausência de ocorrência na família, padrões eletroencefalográficos e prognóstico da doença (ENGEL E PEDLEY, 2008; KORFF e SCHEFFER, 2013; SHORVON, 2013; SHORVON, 2014).

O *status epilepticus* (SE) é caracterizado como uma crise duradoura e pode ser desencadeado por diversos fatores, como trauma, infecção, hipoxia e febre. A

presença do SE é definida como uma crise de 30 minutos ou mais, e está associada com um índice de mortalidade de 20 a 40% (ENGEL e PEDLEY, 2008; GABY, 2007; SHORVON, 2013). O tratamento da epilepsia consiste, basicamente, na terapia farmacológica com anticonvulsivantes, sendo que grande parte desses fármacos tem como alvo deprimir a hiperexcitação, de forma direta ou indireta, através de intensificação da inibição (SHI et al., 2014).

As crises epilépticas estão intimamente relacionadas à neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC) (GABY, 2007; SHORVON, 2014). Sabe-se que o bloqueio da transmissão inibitória dos receptores GABA pode promover um foco epileptogênico. Essa descoberta foi baseada no uso de drogas capazes de induzir crises em modelos experimentais animais, e cujo mecanismo de ação é bloquear a neurotransmissão GABAérgica. Um exemplo clássico desses modelos é o do pentilenotetrazol (PTZ) (ENGEL e PEDLEY, 2008; COPPOLA e MOSHÉ, 2012).

1.1.1 Modelo experimental de crise induzida por pentilenotetrazol (PTZ)

Em virtude das crises epilépticas serem desencadeadas por mecanismos independentes e multifatoriais, modelos animais *in vivo* desempenham importante papel na elucidação e entendimento da patogênese envolvida na epilepsia e nos mecanismos de resposta à intervenção farmacológica e à terapia. Além disso, devido a razões éticas, o uso de modelos animais torna-se essencial para elucidar questões, tais como: consequências fisiopatológicas da progressão da doença, opções farmacológicas após o *status epilepticus*, singularidade de uma amostra de tecido epiléptico de pacientes resistentes à farmacoterapia, entre outras. Essas são algumas das questões que não podem ser respondidas com estudos clínicos (CREMER et al., 2009). A fim de sanar essas dúvidas, uma variedade de modelos animais tem sido desenvolvida. Entre eles, modelos genéticos (como o desenvolvimento de animais nocaute), modelos elétricos (como o *Kindling*) e diversos modelos farmacológicos, como aqueles que usam ácido caínico, pilocarpina, penicilina, 4-aminopiridina, toxina colérica, bicuculina, picrotoxina, pentilenotetrazol, etc. (COPPOLA e MOSHÉ, 2012).

Considerado de alto valor preditivo, o modelo do pentilenotetrazol (PTZ) é utilizado tanto para o desenvolvimento de novos agentes anticonvulsivantes como para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos. Hoje o PTZ não mais é usado na clínica médica, exceto em raros casos de intoxicações com barbitúricos. Essa droga exerce sua ação antagônica por ligar-se ao receptor pós-sináptico GABA_A. Assim, o PTZ reduz os efeitos do GABA endógeno, o que leva o sistema a um estado hiperexcitado. Em doses convulsivantes, o PTZ induz crises generalizadas tônico-clônicas em segundos (PITKÄNEN et al., 2006; CREMER et al., 2009).

As doses de PTZ, administradas nos modelos animais de crises, variam entre os autores. Comumente estão entre 10 a 110mg/Kg. Quando o objetivo é induzir uma única crise convulsiva, a dose é aplicada uma só vez, enquanto que, para a indução de crises repetidas, como no modelo do *Kindling*, são administradas repetidas doses, em concentrações subconvulsivantes, em diferentes intervalos de tempo como a cada 24 ou 48h. O tratamento varia de 2 a 8 semanas (ENGEL e PEDLEY, 2008; CREMER et al., 2009).

O uso do PTZ oferece algumas vantagens, como curto período de latência e mínima neurodegeneração, características que não ocorrem em outros modelos como o cainato e a pilocarpina, nos quais a neurodegeneração é diretamente associada com a resposta inicial à crise (CREMER et al., 2009). Durante as crises tônico-clônicas agudas ou *Kindling* induzido pelo PTZ em camundongos, ocorrem alterações tempo-dependentes na expressão de alguns receptores. Essas alterações vão depender da duração dos processos convulsivos (PITKÄNEN et al., 2006; CREMER et al., 2009).

Considerando-se a satisfatória resposta convulsiva dos animais ao PTZ, a curta latência, a mínima neurodegeneração e as insignificantes alterações nos receptores induzidas pelo PTZ, conclui-se que esse modelo foi adequado ao uso nos estudos aos quais este projeto se propôs.

1.1.2 Epilepsia e inflamação

O conceito de que o cérebro é um órgão imunologicamente privilegiado, tem sido questionado por evidências recentes, mostrando que processos inflamatórios e reações imunológicas ocorrem no SNC após estímulo local e/ou periférico (FRIEDMAN, 2011; SHORVON, 2014).

As vias inflamatórias são amplamente conhecidas por contribuir na patogênese de diversos distúrbios neurodegenerativos, incluindo esclerose múltipla e doença de Alzheimer, além disso, também são ativadas em consequência de infecções neurológicas, isquemia, traumatismo crânio-encefálico, entre outros (FARIAS et al., 2009; SHORVON, 2014), sendo que, um crescente número de evidências suporta uma estreita ligação entre a presença de um processo inflamatório no encéfalo e o desenvolvimento de epilepsia (VEZZANI, 2005, FRIEDMAN, 2011). Nesse contexto, muitos esforços têm sido dedicados para elucidar as relações entre a ocorrência de crises epilépticas e a inflamação. Crises febris em crianças têm sido associadas com o desenvolvimento tardio de epilepsia do lobo temporal (TLE). Além disso, outros tipos de doenças febris, mesmo em pessoas com epilepsia controlada, podem desencadear crises (WALKER e SILLS, 2012). Diversos mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, receptores *Toll-like*, vias de tradução de sinal que recrutam fator nuclear κ -B, fatores do complemento, moléculas de adesão celular, são rapidamente induzidas no cérebro de roedores durante a atividade epiléptica (VEZZANI, 2005; KLEEN e HOLMES, 2008).

No encéfalo, a inflamação pode ser mediada pela imunidade inata, a qual é predominantemente conferida por células da micróglia, que agem como macrófagos residentes do SNC e representam a primeira linha de defesa contra uma agressão (FRIEDMAN, 2011; WALKER e SILLS, 2012; HEINEMANN et al., 2012). A resolução da inflamação dá-se por remoção e/ou eliminação do estímulo causador da agressão, a partir da qual a resposta imunológica é, então, freada. Astrócitos e micróglia direcionam suas atenções à “poda” de sinapses lesadas e a regeneração neuronal, pela liberação de citocinas antiinflamatórias (VEZZANI e FRIEDMAN, 2011, WALKER e SILLS, 2012).

Entretanto, por razões ainda desconhecidas, algumas vezes, a resolução da inflamação é comprometida, fazendo com que a proliferação da micróglia ativada seja perpetuada, e sua função citotóxica, exacerbada. Assim, nestes casos, astrócitos e células da micróglia parecem agir de maneira danosa, contribuindo para a liberação sustentada de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, ao invés de reverter o dano neuronal (TOMKINS et al., 2007; VEZZANI e FRIEDMAN, 2011, WALKER e SILLS, 2012).

Diversos mediadores inflamatórios têm sido estreitamente relacionados ao desenvolvimento de crises (VANE et al., 1998, OLIVEIRA et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2009). Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram o envolvimento de receptores para prostaglandinas e da via da ciclooxigenase-2 nas crises induzidas por pentilenotetrazol. Esses estudos mostraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ e de antagonistas de receptores EP1 e EP3 e ainda agonistas de receptores EP2 atenuam as crises induzidas por PTZ (OLIVEIRA et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das crises induzidas por este agente convulsivante (OLIVEIRA et al., 2008). A PGE₂ também precipita e exacerbiza as crises induzidas por metilmalonato em ratos (SALVADORI et al., 2012). Além destes, tem sido mostrado que a nimesulida, um inibidor preferencial da COX-2, atenua o desenvolvimento de *abrasamento* induzido por PTZ em camundongos, com concomitante redução nos níveis cerebrais de PGE₂, reforçando a idéia do envolvimento de mediadores e enzimas inflamatórias no desenvolvimento de crises (DHIR et al., 2007).

Em camundongos geneticamente susceptíveis a crises, foi observada uma expressão aumentada da COX-2 no encéfalo (OKADA et al., 2001). O mesmo foi observado em pacientes com epilepsia do lobo temporal (DESJARDINS et al., 2003). Essas evidências sugerem que a COX-2 desempenha um papel crítico nos estados convulsivos.

Tem sido evidenciada a presença de mediadores inflamatórios em tecido cerebral (*post mortem*) de pacientes com epilepsias refratárias, como a TLE e a displasia cortical focal (CHOI et al., 2009; RIAZI et al., 2010). Experimentalmente, tem sido mostrado que as crises epilépticas por si só podem induzir neuroinflamação, e que a recorrência dessas crises pode perpetuar a presença do processo inflamatório. Por outro lado, também tem sido sugerido que a pré-

existência de neuroinflamação predispõe a crises epilépticas (RIAZI et al., 2010; VEZZANNI et al., 2012). Estudos epidemiológicos mostraram que até 80% dos pacientes com malária apresentam crises durante a fase aguda da inflamação. Além disso, pacientes com encefalite apresentam crises que podem persistir mesmo após eliminação do agente infeccioso, e são atenuadas por anti-inflamatórios (SINGH e PRABHAKAR, 2008).

Mediadores inflamatórios são produzidos durante a atividade epiléptica pela micróglia e astrócitos no encéfalo de roedores, como parte do mecanismo imunológico inato (ROTHWELL e LUHESHI, 2000). Moléculas pro-inflamatórias, astrócitos reativos, micróglia ativada e outros indicadores de inflamação têm sido encontrados em hipocampo de pacientes com TLE (*post mortem*) (ARONICA et al., 2007; VAN GASSEN et al., 2008). Em particular, citocinas como a interleucina (IL)-1 β , o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a IL-6 são rapidamente expressos após crises, bem como após isquemia e trauma (VEZZANNI, 2005).

Assim, citocinas e mediadores inflamatórios também atuam como neuromoduladores no SNC, afetando o limiar da excitabilidade neuronal, além da participação na ativação da imunidade inata e adaptiva periférica (VEZZANNI et al., 2012). Estudos bioquímicos têm mostrado que a IL-1 β pode facilitar a neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que diminui a recaptação de glutamato pelos astrócitos, aumentando os níveis extracelulares desse mediador, o que, por sua vez, promove a ativação dos receptores NMDA e consequentemente aumenta o influxo de cálcio (VEZZANNI, 2008). Além disso, também tem sido evidenciado que a IL-1 β diminui as correntes mediadas por GABA em culturas de neurônios hipocampais (WANG et al., 2012) aumentando, assim, a excitabilidade no SNC. Por outro lado, acredita-se que o efeito do TNF- α sobre as crises depende dos níveis da IL-1 β no encéfalo e dos subtipos de receptores ativados (VEZZANNI, 2005).

Nesse contexto, foi mostrado que a injeção sistêmica de lipopolissacarídio (LPS) induz inflamação periférica e central em ratos e camundongos e, consequentemente, reduz o limiar para o desenvolvimento de crises, sendo este efeito bloqueado pela administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (SAYYAH et al., 2003). O LPS ativa os receptores *Toll-like* 4 (TLR4), um membro da família de receptores TLR conhecido pelas suas ações sobre a resposta imune inata. Essa família de receptores apresenta capacidade de reconhecer padrões moleculares de reconhecimento de patógenos (PAMPs), bem como os padrões

moleculares de reconhecimento de dano celular (DAMPs) (HAYAKAWA et al., 2013; CHIAVEGATO et al., 2014). Um exemplo de DAMP é a proteína de alta mobilidade do grupo 1 (HMGB1), um marcador de lesão neuronal, a qual se liga aos receptores TLR4 e induz o desenvolvimento de processo inflamatório (CHIAVEGATO et al., 2014). Tem sido sugerido que a HMGB1 pode diminuir o limiar para crises epilépticas, e que, uma vez desenvolvida a crise, esta, por si só, promove a liberação de HMGB1 pelos astrócitos e pela micróglia, promovendo um ciclo de *feedback* positivo tanto das crises, quanto do processo inflamatório (MAROSO et al. 2010). Os efeitos da HMGB1 e da IL-1 β são aparentemente semelhantes, uma vez que ambos podem ser bloqueados por ifenprodil (MAROSO et al., 2010), um antagonista seletivo dos receptores NMDA que contém a subunidade NR2B (YU et al., 1997). Nesse sentido, Chiavegato e colaboradores (2014) investigaram o papel da IL-1 β e HMGB1 na geração de descargas tipo-crise, usando dois modelos de epilepsia focal em fatias de córtex entorrinal de ratos. Os autores mostraram que, no modelo da picrotoxina, ambas citocinas aumentaram a frequência média das descargas tipo-crise, enquanto somente a IL-1 β reduziu a latência e prolongou a duração do primeiro episódio tipo-ictal. No segundo modelo, usando um pulso único de NMDA (inativo *per se*), este apresentou atividade excitatória quando realizado após aplicação local de IL-1 β e HMGB1.

Também tem sido mostrado em modelo de lesão aguda de pulmão, induzida por LPS, que a lesão pulmonar foi associada com uma geração robusta de fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), de leucotrieno B4 (LTB4) e de HMGB1. O bloqueio do receptor de MIF e / ou do receptor de LTB4 resultou na proteção contra a lesão induzida por LPS. Estes resultados indicam que a via dos mediadores MIF e LTB4 está envolvida na imunopatogênese da lesão pulmonar experimental induzida por LPS (RITTIRSCH et al., 2008).

Lazarewicz e colaboradores (1992) mostraram que NMDA induz a liberação de ácido araquidônico em cultura de neurônios cerebelares, e Ciceri e colaboradores (2001) mostraram que MK-801, antagonista do receptor NMDA, reduziu a liberação de LTC4, um dos principais metabólitos da 5-LOX, em encéfalo isquêmico de ratos. Assim, a excitotoxicidade mediada pelo NMDA pode iniciar a resposta pós-isquêmica, ou seja, o desenvolvimento do processo inflamatório. Esses achados sugerem que a ativação da 5-LOX está envolvida com a ativação dos receptores NMDA.

1.1.3 Lipoxigenases e leucotrienos

O metabolismo do ácido araquistônico pode levar à síntese de diversos mediadores, entre eles, os leucotrienos (SIMMET et al., 1990). outrora conhecidos como substância de reação lenta da anafilaxia (SRLA), os leucotrienos foram descobertos em 1938 por Trethewie e Kellaway, sendo quimicamente caracterizados por Samuelsson no final da década de 70 (SAMUELSSON, 1979, DENZLINGER, 1996). Esses mediadores são eicosanóides oriundos da cascata do ácido araquistônico, sendo classificados de acordo com a presença de um resíduo de cisteína em dois tipos: leucotrienos cisteínicos e leucotrienos não cisteínicos (DENZLINGER, 1996).

O nome leucotrieno deve-se ao fato de serem compostos trienos (três duplas ligações alternadas, e geometria trans), com perfil estrutural comum entre si, e serem produzidos por leucócitos, onde foram primeiramente identificados (Denzlinger, 1996). Os leucotrienos são lipídeos derivados de ácidos graxos essenciais de 20 carbonos, possuindo três, quatro ou cinco duplas ligações, são eles: o ácido 8,11,14 – eicosatrienoico, (ácido linolênico); o ácido 5, 8, 11, 14 - eicosatetraenoico (ácido araquistônico – AA) (Fig. 1) e o ácido 5, 8, 11, 14, 17 – eicosapentaenoico (EPA). Em seres humanos, o ácido araquistônico é o mais abundante precursor de leucotrienos (CHU e PRATICO, 2009).

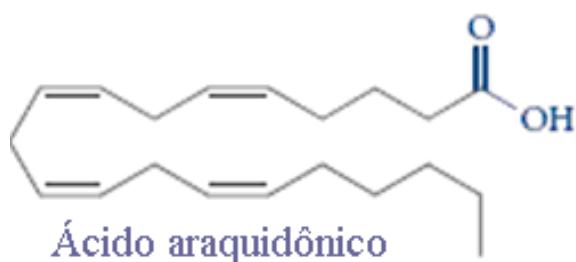


Figura 1 – Estrutura química do ácido araquistônico (AA).

Fonte: <http://www.chem.latech.edu/chem121/Lipids.htm>.

A principal fonte de ácido araquistônico são os fosfolipídeos das membranas, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol. O ácido

araquidônico é liberado para a célula via hidrólise desses fosfolipídeos na posição *sn*-2 do diacilglicerol (DAG), como consequência de um aumento da concentração intracelular de cálcio, a qual determina a ativação da fosfolipase A₂. Além desta, também podem cumprir esse papel as fosfolipases C e D.

1.1.3.1 Lipoxigenases

O ácido araquidônico liberado serve como substrato para as lipoxigenases (LOXs). As LOXs são dioxigenases que, embora contenham ferro, são desprovidas de heme. Estas enzimas inserem oxigênio molecular na posição 5, 12 ou 15 da cadeia alifática da molécula do seu substrato, um ácido graxo com duas duplas ligações *cis* separadas por um grupo metíleno, o principal substrato utilizado é o ácido araquidônico, o qual contém várias duplas ligações nessa configuração (DENZLINGER, 1996). As LOX apresentam peso molecular em torno de 75 a 78 KDa e consistem em uma única cadeia polipeptídica com dois domínios: o domínio maior, no qual predomina a forma de α -hélice e contém o grupamento ferro não heme como parte integral do sítio ativo e ainda o bolsão de ligação com o substrato, e o domínio menor na forma β -pregueada com função desconhecida (Figura 2) (PHILLIS et al., 2006).

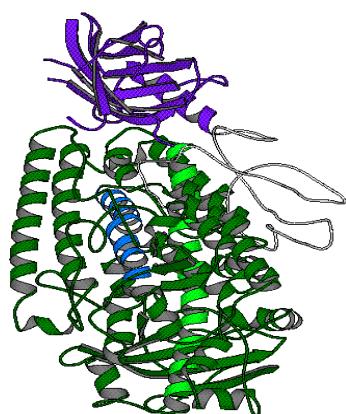


Figura 2 – Estrutura básica tridimensional das lipoxigenases.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=66615>.

Há cinco lipoxigenases humanas ativas: 5-LOX, 12(S)-LOX, 12(R)-LOX, 15-LOX-1 e 15-LOX-2 (Figura 3) classificadas conforme a inserção do oxigênio e, quando necessário, conforme a estereoconfiguração (S ou R). A atividade de cada uma destas enzimas resulta em diferentes metabólitos, dependendo do tipo de célula e do contexto na qual se encontra (DENZLINGER, 1996).

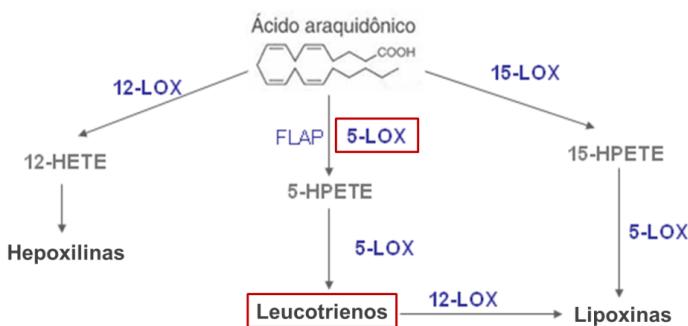


Figura 3 – Via das Lipoxigenases.

Legenda: LOX: Lipoxigenase; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico; FLAP: proteína ativadora da 5-LOX.
Fonte: Adaptado de Denzlinger (1996).

1.1.3.1.1 5-Lipoxigenase (5-LOX)

Quando há ativação de eosinófilos, mastócitos, monócitos ou leucócitos polimorfonucleares, a 5-LOX migra do citosol para a membrana nuclear (translocação), ligando-se à proteína ativadora da 5-LOX (*5-lipoxygenase activating protein - FLAP*) (Figura 4), uma proteína integral da membrana constituída por 161 aminoácidos, dando início, assim, à biossíntese dos leucotrienos. Um novo modelo de fármaco, o MK-886, tem sido utilizado com sucesso para inibir a ação da PLA₂ em virtude de ligar-se à FLAP (PHILLIS et al., 2006; HUANG et al., 2012).

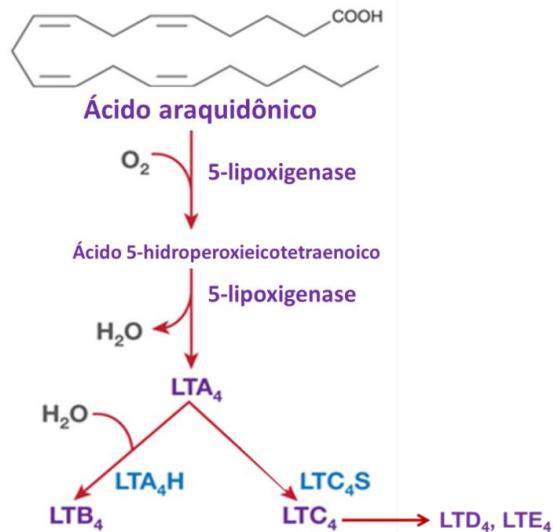


Figura 4 – Geração de leucotrienos, a partir do ácido araquidônico, pela ação da 5-LOX

Fonte: adaptado de Hedi and Norbert (2004).

Uma reação em dois estágios é catalisada pela 5-LOX: a oxigenação do AA no carbono 5 para formar 5-HPETE (ácido hidroperoxieicosatetraenóico), seguida da desidratação deste, levando à formação de um composto instável, o LTA₄, o qual é biotransformado em eicosanóides bioativos por múltiplas vias, dependendo do contexto celular (Figura 5) (DENZLINGER, 1996).

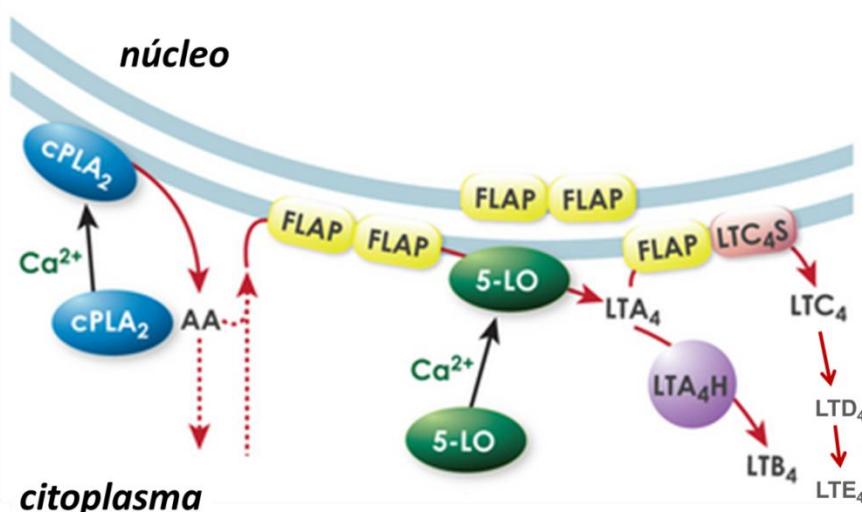


Figura 5 – Translocação da 5-LOX e biossíntese dos leucotrienos no citoplasma.

Fonte: <https://www.caymanchem.com>.

1.1.3.1.2 Geração de leucotrienos a partir da 5-LOX

O LTA₄ pode ser convertido em LTB₄ pela LTA₄ hidrolase, uma enzima citosólica que contém zinco como seu centro catalítico, ou convertido em LTC₄, pela enzima LTC₄ sintase, a qual catalisa a conjugação da glutationa ao carbono 6 do LTA₄. A LTC₄ sintase é o único membro da família glutationa-S-transferase. O LTA₄, precursor da família dos leucotrienos cisteínicos, pode ainda, sofrer metabolização transcelular (DENZLINGER, 1996, CHU e PRATICO, 2009). A geração de leucotrienos a partir 5-LOX inicia, basicamente, quando há translocação da enzima para o envelope nuclear. Porém, esta translocação não ocorre somente no sentido citosol-membrana nuclear, mas também no sentido núcleo-membrana nuclear, uma vez que a síntese de leucotrienos pode ocorrer também dentro do núcleo (Figura 6).

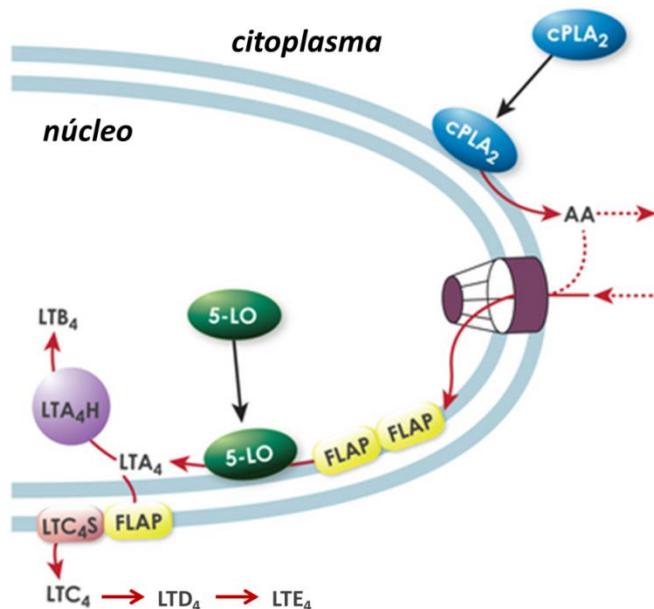


Figura 6 – Biossíntese dos leucotrienos dentro do núcleo.

Fonte: <https://www.caymanchem.com>.

A partir daí, o LTB₄ e o LTC₄ são exportados da célula via sistemas carreadores localizados na membrana plasmática. Chegando ao espaço

extracelular, o LTC4 é convertido em LTD4 através da clivagem do ácido glutâmico pela γ -glutamil transferase (γ -GT), seguida da remoção da glicina por uma dipeptidase, resultando em LTE4 (Figura 7) (CHEBOLU et al., 2009).

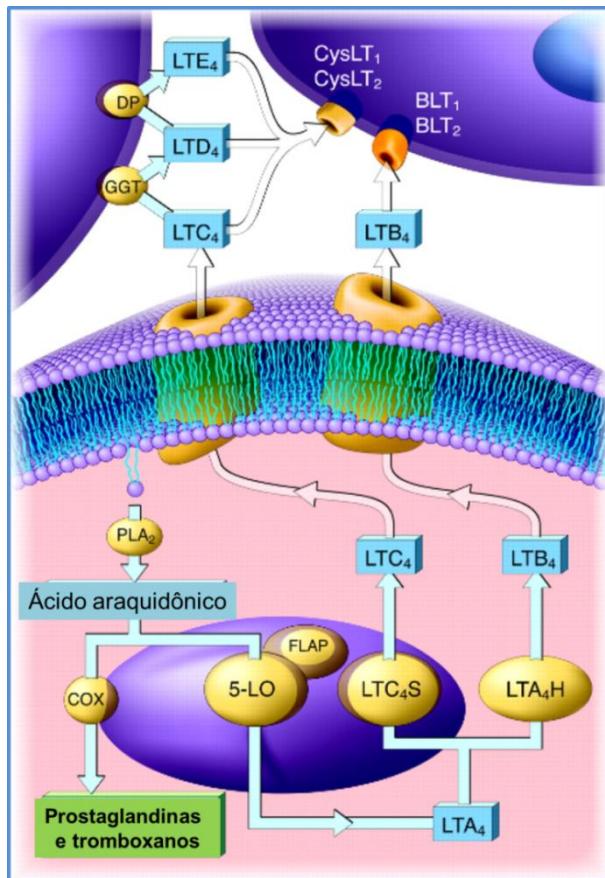


Figura 7 – Transporte dos leucotrienos para o meio extracelular.

Fonte: Adaptado de Sveinbjörnsson et al., 2008.

1.1.3.1.3 Degradação dos leucotrienos

O LTC4 e o LTD4 que não foram convertidos em LTE4 são metabolizados e inativados no espaço extracelular, assim como o LTA4 (DENZLINGER, 1996, CHEBOLU et al., 2009). A degradação intracelular do LTB4 e do LTE4 resulta na sua inativação biológica. Esta começa com ω -oxidação (em peroxissomas e mitocôndrias), resultando em ω -hidróxido-leucotrieno, ω -aldeído-leucotrieno e ω -

carboxi-leucotrieno, sendo que este último serve como substrato para a β -oxidação final (DENZLINGER, 1996, CHEBOLU et al., 2009).

Há geração de leucotrienos em células endoteliais, epidérmicas, hemácias, linfócitos, plaquetas, células musculares lisas, neurônios e astrócitos. Considera-se que a biossíntese dos leucotrienos esteja diretamente relacionada à diferenciação celular. Em humanos, macrófagos alveolares expressam mais 5-LOX e FLAP do que monócitos da corrente circulatória. Em neonatos, a produção e a resposta do LTB4 são diminuídas, em virtude disso, há um aumento da suscetibilidade a infecções (PHILLIS et al., 2006; SMYTH et al., 2006).

Nas membranas dos neurônios, o AA é liberado principalmente pela ação da PLA₂ citosólica (PLA₂C), enquanto o ácido docosaenóico (DHA) (Figura 8) é liberado pela ação da fosfolipase A₂ plasmalogênio-seletiva (PlsEtnPLA2). O AA livre é reincorporado aos fosfolipídeos da membrana neuronal por reações de reacilação ou oxidados por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos a vários metabólitos oxigenados com importantes funções neuroquímicas. A ação da PLA₂ sobre o AA resulta na produção dos eicosanoides, enquanto a ação da PlsEtnPLA₂ gera docosanoides, os quais não somente antagonizam os efeitos dos eicosanoides, mas também modulam a migração leucocitária e a expressão das citocinas no sistema nervoso central (PHILLIS et al., 2006).

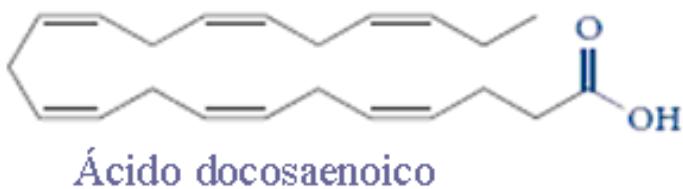


Figura 8 – Estrutura química do ácido docosaenoico (DHA).

Fonte: Piomelli et al., 2007.

Como nos tecidos não neuronais, três isoformas de LOX estão presentes no encéfalo: a 5-LOX, a 12-LOX e a 15-LOX, encontradas basicamente em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (DENZLINGER, 1996). Alguns estudos de clonagem das isoformas da LOX têm fornecido informações mais detalhadas sobre sua

expressão e localização nos tecidos. Tem sido mostrada uma significante expressão da 5-LOX e da 12-LOX em neurônios. Outra enzima presente no cérebro é a proteína ativadora da 5-LOX e da 12-LOX, a FLAP. Essa proteína é expressa em neurônios e em várias regiões do cérebro, apresentando uma expressão mais proeminente no hipocampo e no cerebelo (MANEV et al., 1998).

1.1.3.1.4 Efeitos fisiopatológicos dos leucotrienos

Assim, como os demais eicosanoides, os leucotrienos exibem numerosos e diversos efeitos nos sistemas biológicos. Os leucotrienos não cisteínicos possuem efeitos quimiotáticos e quimiocinéticos sobre os leucócitos polimorfonucleares. Eles induzem a aderência dos neutrófilos às células do endotélio vascular e intensificam a migração destes para os tecidos extravasculares, promovendo o desenvolvimento do processo inflamatório (DENZLINGER, 1996, WANG et al., 2006, WANG et al., 2011). Em concentrações mais altas, o LTB4 estimula a agregação de leucócitos polimorfonucleares, promovendo a degranulação e a geração de superóxido. A atividade quimiotática dos leucotrienos não cisteínicos é mediada por dois receptores acoplados à proteína G: BLT1 e BLT2, sendo o primeiro expresso exclusivamente em leucócitos polimorfonucleares humanos (DENZLINGER, 1996; BÄCK et al., 2014). Estudos com camundongos no caute para BLT1 confirmaram o papel do LTB4 na quimiotaxia, na adesão e no recrutamento de leucócitos nos tecidos inflamados (MONTEIRO et al., 2011).

O LTC4 causa contração da musculatura lisa brônquica na asma. Esse leucotrieno cisteílico também aumenta o extravasamento vascular, o que conduz ao edema inflamatório. Essa capacidade dos leucotrienos cisteínicos de aumentar a permeabilidade vascular é uma das causas do extravasamento da barreira hematoencefálica nos processos inflamatórios (HEDI e NORBERT, 2004).

1.1.3.1.5 Receptores para leucotrienos cisteínicos

Atualmente já se tem identificados pelo menos quatro tipos de receptores para leucotrienos cisteínicos: GPR17, CysLT(E), CysLT1 e CysLT2, sendo os dois últimos considerados de maior importância (SMYTH et al., 2006; SINGH et al., 2012, BÄCK et al., 2014).

Tanto CysLT1 quanto CysLT2 são receptores acoplados à proteína Gq (DENZLINGER, 1996). A sinalização inicia com o aumento da hidrólise do fosfatidilinositol e também da concentração de intracelular de cálcio, a partir daí, com a ativação das MAP quinases inicia-se alguns processos como diferenciação e proliferação celular, quimiotaxia e liberação de mediadores inflamatórios. Ambos receptores apresentam-se distribuídos de forma limitada, sendo CysLT1 mais abundante no trato respiratório, na musculatura lisa intestinal, nos leucócitos do sangue periférico e no cérebro, enquanto CysLT2 é expresso principalmente no coração, no baço, na medula suprarrenal e no cérebro. Antagonistas não específicos desses receptores, como o Bay u9773, são úteis quando o objetivo é bloquear a atividade tanto de CysLT1 quanto de CysLT2 (DENZLINGER, 1996; CHEBOLU et al., 2009; BÄCK et al., 2014).

Tanto LTC4 quanto LTD4 ativam os receptores CysLT causando hipotensão. Embora apresentem efeito leve sobre a maior parte das grandes artérias ou veias, as artérias coronárias e os segmentos distais da artéria pulmonar são afetados em presença de concentrações, mesmo ínfimas, desses agentes. Considerados vasodilatadores, seus efeitos mais proeminentes são sobre a microvasculatura, sendo mais de mil vezes mais potentes que a histamina (CHEBOLU et al., 2009).

Como os demais eicosanóides, os leucotrienos não só desempenham funções específicas nos processos fisiológicos como também nos patológicos. No sistema nervoso central, inibidores da LOX e/ou antagonistas dos leucotrienos têm constituído um alvo para o desenho de novos fármacos, tanto no tratamento de inflamações neurológicas (Phillis et al., 2006), como no estudo da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas associadas à idade. Alguns estudos têm mostrado uma associação entre a expressão da 5-LOX e doenças degenerativas causadas por lipoperoxidação (MANEV et al., 1998, CHU e PRATICO, 2009).

A ativação da via da 5-LOX tem sido identificada tanto em estudos *in vitro* quanto *ex vivo* em tecidos cerebrais (SIMMET e TIPPLER, 1990, HEDI e NORBERT, 2004). Pesquisas têm mostrado que as crises induzidas por ácido caínico em ratos, são acompanhadas por formação, dose-dependente, de leucotrienos, a qual pode ser reduzida tanto pelo uso de fenidona quanto pelo BW755C, ambos inibidores duais da via da COX/LOX. Esses achados suportam o envolvimento dos leucotrienos nas crises (SIMMET e TIPPLER, 1990, KIM et al., 2000). Além do uso de inibidores da via, o tratamento com montelucaste, um agonista inverso de receptores para leucotrienos CysLT1R, e também com 1,2,3,4, tetrahidroisoquinolina, inibidor da síntese de LTD4, é capaz de suprimir tanto o desenvolvimento de crises induzidas em modelos experimentais de abrasamento quanto aquelas recorrentes espontâneas induzidas por pilocarpina em ratos (REHNI AND SINGH, 2011).

1.1.4 Barreira hematoencefálica (BHE)

O sistema nervoso central é considerado, imunologicamente, isolado do resto do organismo, participando muito pouco das reações imunes. Isso acontece devido à existência de uma barreira, a hematoencefálica (BHE) que impede a passagem de macromoléculas. A BHE é uma estrutura que dificulta o acesso de substâncias do sangue para o sistema nervoso central, tais como anticorpos, sistema complemento e fatores de coagulação. Ela foi descoberta pelo bacteriologista Paul Ehrlich no século XIX, que injetou o corante azul de tripano em ratos, constatando a presença do corante em todos os espaços extra vasculares dos tecidos, exceto no tecido nervoso, indicando que esses corantes não atravessam a parede dos capilares cerebrais (HAWKINS E DAVIS, 2005). Trinta anos mais tarde, um estudante de Ehrlich, Edwin Goldmann notou que, quando esse corante era injetado no líquor, observava-se a coloração somente no tecido cerebral. Assim, ele concluiu que, no encéfalo, existia algo que impedia a troca de substâncias entre o sangue e o tecido nervoso, a BHE, sendo que o termo “bluthirnschranke” – barreira hematoencefálica foi utilizado, pela primeira vez, por Lewandowsky (1900), quando observou que o ferricianeto de potássio apresentava um baixo limite de permeabilidade no encéfalo (DAVSON, 1976).

Uma composição constante e bem controlada do fluido extracelular no encéfalo é essencial para funcionamento neuronal eficiente. O SNC de invertebrados, o qual é extremamente menos complexo que o dos mamíferos, também é protegido contra flutuações na composição dos fluidos corporais por uma barreira que é formada pelas células gliais, e esse “arranjo” de células também aparecem em algumas espécies ancestrais de vertebrados (HAWKINS e DAVIS, 2005; CARDOSO et al., 2010)

Como o SNC vai se tornando mais complexo conforme a evolução, foi nesse processo que houve o surgimento de uma barreira endotelial, promovendo forte vantagem seletiva, consequentemente, todos os vertebrados atualmente existentes, com exceção de algumas espécies de peixes, possuem a BHE (REDZIC, 2011).

A BHE é composta pelo endotélio microvascular, astrócitos, membrana basal, pericitos e neurônios que estão fisicamente próximos do endotélio. Estes elementos são parte da chamada “unidade neurovascular” (Figura 9). Em condições fisiológicas, a BHE garante constante fornecimento de nutrientes (oxigênio, glicose, e outras substâncias) para as células do encéfalo (STAMATOVIC et al., 2008).

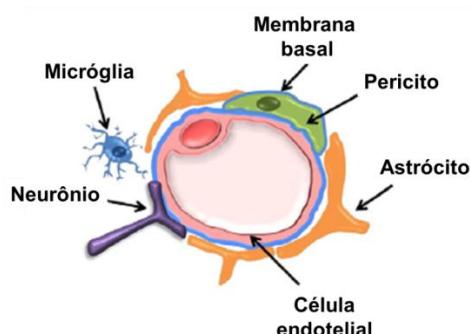


Figura 9 – Esquema representativo da unidade neurovascular.

Fonte: Adaptado de Cardoso et al., 2010.

Diversas doenças neurodegenerativas estão associadas a um prejuízo na unidade neurovascular, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, bem como em doenças onde haja a presença de processo inflamatório encefálico, como infecções, acidente vascular encefálico, demência, esclerose múltipla, epilepsia, entre outras (PERSIDSKY et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; MARCHI et al., 2009; HEINEMANN et al., 2012).

A BHE está presente em todas as regiões do encéfalo, exceto naquelas reguladas pelo sistema nervoso autônomo e nas glândulas endócrinas, onde os vasos sanguíneos permitem a difusão de moléculas (PERSIDSKY et al., 2006). As duas principais funções da BHE são impedir a livre difusão entre os fluidos do encéfalo e do sangue e proporcionar processos de transporte de nutrientes essenciais, íons e resíduos metabólicos (REDZIC, 2011).

A membrana basal é parte essencial da BHE. Ela envolve as células endoteliais e os pericitos, fazendo uma espécie de ancoramento dessas células. Ela é constituída por 3 lâminas, compostas por moléculas de diferentes classes: a) proteínas estruturais (colágeno e elastina); b) proteínas especializadas (fibronectina e laminina); e c) proteoglicanas. Na membrana basal também estão presentes receptores de adesão, conhecidos como moléculas de adesão celular (CAM), bem como proteínas de sinalização, as quais formam uma extensiva e complexa matriz (STAMATOVIC et al., 2008; ZLOKOVIC et al., 2008; CARDOSO et al., 2010; PERSIDSKY et al., 2006).

Além da membrana basal, a micróglia também desempenha importante papel na constituição da BHE. Ela se encontra sob duas formas: ativada ou em repouso. Quando está em repouso, as células apresentam-se com corpos pequenos e processos finos e longos, por outro lado, quando ativada assume uma morfologia fagocítica, com processos curtos. As células da micróglia são também chamadas de macrófagos residentes do SNC (ZLOKOVIC et al., 2008; CARDOSO et al., 2010). Como a micróglia é encontrada no espaço perivascular, é a interação com as células endoteliais que contribui para a manutenção das propriedades da barreira, embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorre, ainda não esteja totalmente esclarecido (ZLOKOVIC et al., 2008; PERSIDSKY et al., 2006).

Como a micróglia, os neurônios também são componentes da unidade neurovascular, porém pouco se sabe sobre seu papel exato na BHE, embora existam algumas evidências de que estes, por mecanismo ainda desconhecido, possam induzir as células endoteliais a sintetizar determinadas enzimas (ABBOTT et al., 2010; PERSIDSKY et al., 2006).

Outro componente da BHE, e não menos importante, são as células chamadas pericitos, também conhecidas como células musculares lisas ou miofibroblastos (ARMULIK et al., 2010). Os pericitos são células planas, indiferenciadas, de tecido conjuntivo contrátil, que se desenvolvem em torno das

paredes dos capilares da microvasculatura encefálica. Estas células não apresentam a isoforma da actina- α , indicando que não estão envolvidas na contração capilar. Parte dos pericitos provém de linhagem de macrófagos, possuindo capacidade para fagocitar proteínas exógenas (PERSIDSKY et al., 2006; ARMULIK et al., 2010). Os pericitos têm uma estreita associação física com as células endoteliais e compartilham com elas, a mesma membrana basal. Tem sido sugerido que estas células auxiliam na regulação da proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das células endoteliais. Além disso, tem sido evidenciado que os pericitos podem induzir e regular a atividade funcional da glicoproteína-P (Gp-P) (ABBOTT et al., 2010; ARMULIK et al., 2010).

Os astrócitos são células gliais cujos pés formam um rendilhado estreitamente sobreposto sobre a superfície externa do endotélio da BHE, cobrindo mais de 99% dele (PERSIDSKY et al., 2006). Eles têm importante papel na síntese das proteoglicanas, auxiliando na manutenção das células endoteliais. A estreita relação física dos astrócitos com as células endoteliais reduz a possibilidade de alguma área de lacuna (ABBOTT, et al., 2010). Os astrócitos também são fundamentais para o funcionamento neuronal adequado, e a estreita proximidade dos corpos neuronais aos capilares encefálicos, bem como aos astrócitos, sugere que as interações entre esses elementos sejam essenciais para a manutenção da unidade neurovascular (PERSIDSKY et al., 2006).

Compondo a base da unidade neurovascular, estão as chamadas células endoteliais, ou endotélio encefálico propriamente dito, e atuam como mediadores entre o sangue periférico e o encéfalo, regulando a entrada e saída de substâncias, de forma singular e diferenciada dos demais endotélios. O endotélio encefálico é cerca de 50-100 vezes mais forte do que os demais, como resultado das propriedades especiais que causam restrição severa da via paracelular para difusão de solutos hidrofílicos (ABBOTT, 2010).

As células endoteliais tem espessura uniforme, sem fenestras, baixa atividade pinocítica e uma membrana basal contínua. Apresentam carga celular negativa, repelindo negativamente compostos com carga. Possuem maior número de mitocôndrias em relação ao endotélio de outros órgãos, fazendo com que o potencial energético seja aumentado nos capilares encefálicos, fornecendo energia para as enzimas digestivas e para os transportadores seletivos que usam ATP (PERSIDSKY et al., 2006; REDZIC, 2011).

Essas células possuem estreitas junções de proteínas que eliminam qualquer tipo de lacuna entre as células, evitando a livre difusão de substâncias do sangue para dentro do encéfalo. As principais junções são as junções oclusivas e as junções aderentes (Figura 10) (ABBOTT et al., 2010; REDZIC, 2011).

As junções de oclusão são as principais estruturas responsáveis pelas propriedades de barreira. São classificadas em integrantes e acessórias, e formam um conjunto complexo de proteínas localizadas na região apical das células endoteliais. Essas junções promovem uma espécie de “selamento” entre as células, que regula a difusão entre a membrana plasmática apical e basolateral, limitando a permeabilidade paracelular. As junções de oclusão são estruturas altamente dinâmicas, que estão sob a estreita regulação do microambiente encefálico (PERSIDSKY et al., 2006, CARDOSO et al., 2010).

Estruturalmente, essas junções formam um complexo de filamentos de proteínas transmembranas e citoplasmáticas, paralelamente interconectadas, dispostas como uma série de barreiras múltiplas (WOLBURG e LIPPOLDT, 2002). As proteínas transmembranas são proteínas integrais que interagem com a membrana plasmática da célula adjacente e são agrupadas de acordo com o número de vezes que atravessam a membrana: as chamadas “*single-pass*”, atravessam uma única vez, tais como as moléculas juncionais de adesão (JAM), enquanto que as “*four-pass*”, possuem quatro domínios transmembrana, como as claudinas e ocludinas (WOLBURG E LIPPOLDT, 2002; ARMULIK et al., 2010).

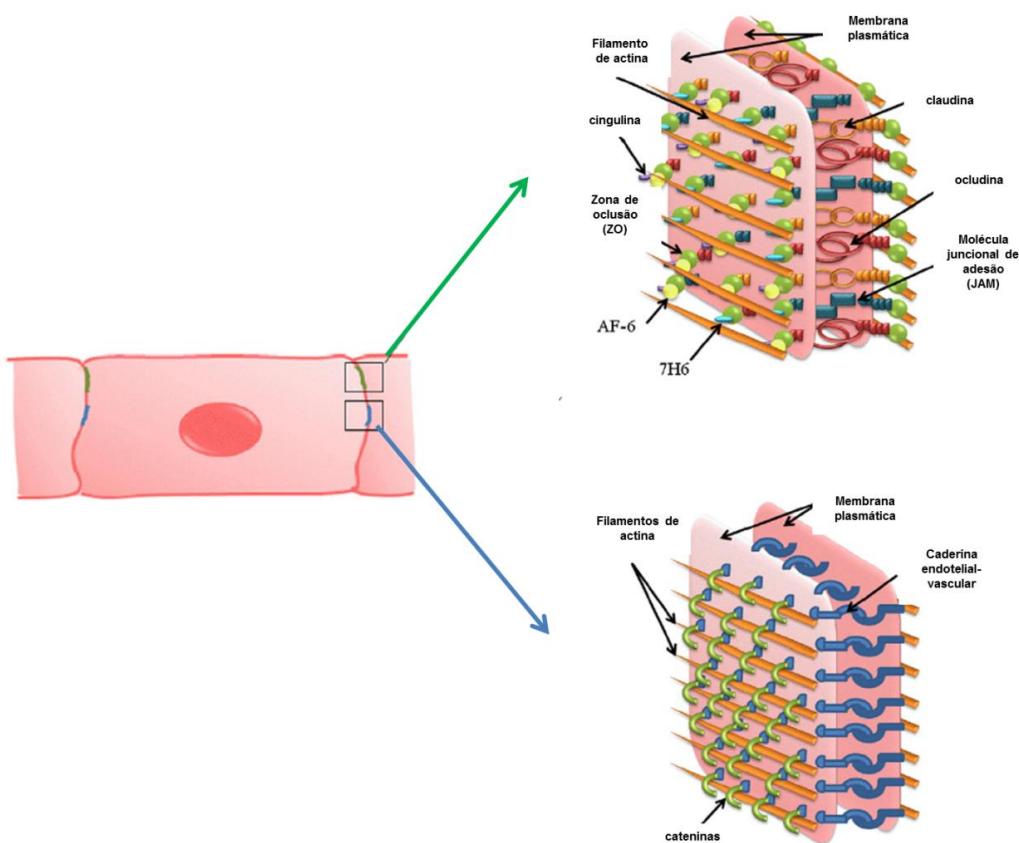


Figura 10 – Esquema representativo do complexo juncional para adesão das células endoteliais.

Legenda: verde – junções de oclusão; azul – junções aderentes.

Fonte: Adaptado de Cardoso et al., 2010.

As proteínas acessórias das junções de oclusão, como as da família ZO, cingulina, 7H6 e FA-6, estão envolvidas na ligação das junções de oclusão integrantes ao citoesqueleto de actina (PERSIDSKY et al, 2006).

As claudinas e as ocludinas são proteínas das junções de oclusão com 4 domínios transmembrana porém não compartilham nenhuma homologia na sequência. (PERSIDSKY et al., 2006; STAMATOVIC, 2008). As claudinas formam dímeros que se ligam a outras claudinas das células endoteliais adjacentes. Assim, as claudinas formam um tipo de “selamento” primário das junções de oclusão, enquanto que as ocludinas formam um apoio adicional à estrutura (GREENWOOD, 1991, STAMATOVIC, 2008; ABBOTT, 2010; HU, 2013).

As chamadas proteínas citoplasmáticas, que também fazem parte do complexo das junções de oclusão, são proteínas associadas localizadas sob a parte interna da membrana, conhecidas como família ZO, compreendem ZO-1, ZO-2 e

ZO-3. Essas proteínas pertencem à família das proteínas gualinato quinases associadas à membrana (MAGUK), as quais agem como proteínas de reconhecimento para a exata posição das junções de oclusão, bem como desempenham função de suporte para as proteínas de sinalização (GREENWOOD, 1991; CARDOSO et al., 2010).

As moléculas juncionais de adesão são uma família de proteínas descobertas recentemente, específicas das células endoteliais. Consistem de 3 proteínas designadas JAM-1, JAM-2 e JAM-3, também conhecidas como JAM-A, JAM-B e JAM-C, respectivamente. Estas são proteínas da superfamília da IgG, compostas por uma única cadeia transmembrana com um grande domínio extracelular (CARDOSO et al., 2010; HU et al., 2014).

Abaixo das junções de oclusão, na região basal da membrana plasmática lateral, estão as junções aderentes, formando uma cadeia contínua de adesão. As junções aderentes medeiam eventos, tais como adesão de uma célula endotelial à célula vizinha, inibição por contato durante o crescimento vascular, remodelação celular, promovem o início da polaridade celular bem como a regulação da permeabilidade paracelular (HAWKINS E DAVIS, 2005). Contribuem ainda para a função de barreira propriamente dita. A adesão célula-célula, através de filamentos de actina, envolve proteínas como as caderinas e as cateninas. A família das caderinas, associada às proteínas cateninas intracelulares, formam um complexo de vital importância para os processos morfogênicos durante o desenvolvimento dos tecidos animais, e ainda auxiliam a manutenção da integridade dos tecidos adultos (HAWKINS E DAVIS, 2005, CARDOSO, 2010)

As caderinas são proteínas de adesão celular dependentes de cálcio. Compreendem uma família de glicoproteínas transmembrana, definidas como as maiores proteínas transmembrana das junções aderentes. Uma diminuição/remoção do cálcio extracelular pode levar à ruptura da cadeia das caderinas, e, consequentemente, a abertura das junções (HAWKINS e DAVIS, 2005, CARDOSO, 2010).

As cateninas foram primeiramente caracterizadas como domínio intracelular das caderinas que ligava estas ao citoesqueleto de actina. Atualmente são classificadas como uma classe de proteínas distinta das caderinas, embora sua principal função continue sendo a ancoragem do complexo proteico formado pelas caderinas ao citoesqueleto. Além disso, as cateninas também participam de algumas

vias de sinalização celular. São conhecidas 4 isoformas de cateninas: α -, β -, δ - and γ -catenina. As principais são as α - and β -catenina, estão localizadas na porção interendotelial das junções, e sua expressão é requerida pelas caderinas (HAWKINS e DAVIS, 2005; STAMATOVIC et al., 2008).

Alguns estudos têm indentificado uma estreita relação entre o grau de adesão e a fosforilação de proteínas das junções (Figura 11). Tem sido mostrado que, diferentes quinases, podem fosforilar resíduos de aminoácidos distintos. Estudos têm relacionado à fosforilação de resíduos de aminoácidos como serina e tirosina à presença de estímulos como: estresse oxidativo (radicais livres, óxido nítrico), agentes vasogênicos (fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF), mediadores inflamatórios (TNF- α , PGE2, leucotrienos), agentes infecciosos (HIV) (HAWKINS E DAVIS, 2005; PERSIDSKY et al., 2006; STAMATOVIC et al., 2008).

As rotas de sinalização envolvem, principalmente, proteínas quinases, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), proteínas-G e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A fosforilação dispara uma cascata de eventos bioquímicos e alterações conformacionais nas células endoteliais, que culmina com a abertura das junções. Além disso, a sinalização mediada pelo cálcio leva a internalização ou degradação das moléculas proteicas das junções, juntos todos esses eventos promovem a hiperpermeabilidade da rota paracelular (Hawkins e Davis, 2005; Stamatovic et al., 2008).

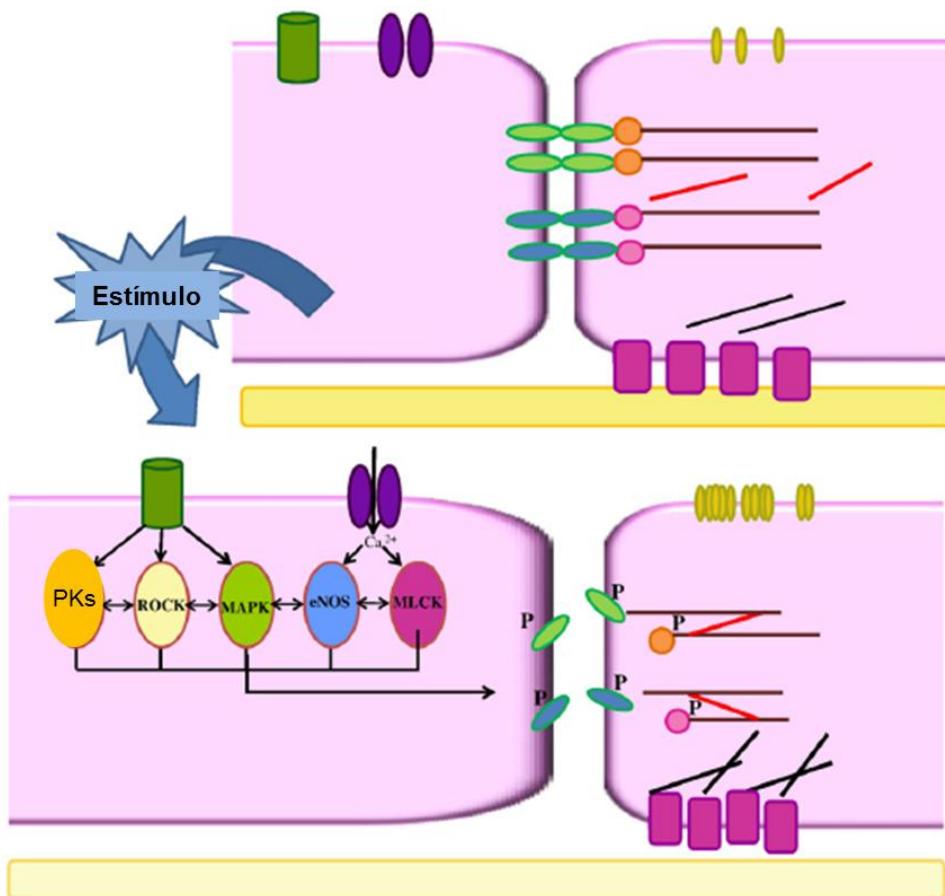


Figura 11 – Esquema representativo das múltiplas vias que regulam a permeabilidade paracelular.

Legenda: Verde - Junções de adesão; azul – junções aderentes; marrom – proteínas transmembrana de ancoramento ao itoesqueleto de actina; laranja/rosa – proteínas citosólicas de ancoramento ao citoesqueleto de ctina; roxo – proteínas integrais; P – fosforilação.

Fonte: Adaptado de Cardoso et al., 2010.

A proteína quinase C (PKC) é a principal quinase reguladora da permeabilidade celular mediada pelas junções de oclusão. Essa proteína pode alterar a permeabilidade da barreira por diversos mecanismos, afetando diferentes estruturas, tais como, junções celulares, moléculas de adesão do citoesqueleto à matriz extracelular, ativação de cascatas de sinalização intracelulares. Tem sido demonstrado que um estímulo pode ativar a PKC, e esta por sua vez, fosforilar resíduos de aminoácidos das ocludinas, levando a desestruturação da junção, e rearranjo do citoesqueleto das células endoteliais encefálicas (PERSIDSKY et al., 2006; STAMATOVIC et al., 2008).

Diversas doenças têm sido relacionadas à ruptura das junções endoteliais, e consequentemente, abertura da barreira hematoencefálica, tais como mal de Alzheimer (LI et al., 2014), doença de Parkinson (CHUNG et al., 2013), trauma crânio encefálico (ALVES, 2014) e epilepsia (HEINEMANN et al., 2012).

1.1.4.1 Barreira hematoencefálica e crises

Historicamente, a convergência entre estudos da BHE e as investigações clínicas das epilepsias estavam limitadas a interações entre supostas drogas antiepilepticas e o endotélio. Esses estudos eram baseados na observação de que muitas drogas antiepilepticas promissoras eram excluídas pela BHE e assim, clinicamente inviáveis. (FRIEDMAN et al., 2009, FRIEDMAN, 2011, HEINEMANN et al., 2012). Nas últimas décadas, dados experimentais e clínicos mostram que a relação entre permeabilidade da BHE e epilepsia refratária vai além da extrusão de fármacos. Estudos mostram que alterações na permeabilidade da BHE desencadeiam uma série de eventos que podem levar ao desenvolvimento de crises epilépticas (OBY e JANIGRO, 2006, FRIEDMAN et al., 2009; HEINEMANN et al., 2012).

De fato, tem sido descrito aumento no número de crises espontâneas em animais com maior ruptura da BHE seguindo o SE induzido por pilocarpina, sugerindo um papel direto da disfunção da BHE na epileptogênese (OBY e JANIGRO, 2006, VAN VLIET et al., 2007; HEINEMANN et al., 2012). Fabene e colaboradores (2008) observaram que após a administração de pilocarpina em ratos, há um aumento na expressão de moléculas de adesão de leucócitos à barreira, as quais são importantes intermediárias para o extravasamento durante o processo inflamatório. Além disso, e mais importante, os resultados mostram que os animais que não têm tal migração apresentam menos crises.

Esses dados sugerem uma ligação patogênica entre a interação dos leucócitos com o endotélio, o dano na BHE e a geração de crises. Embora o mecanismo pelo qual a ruptura da BHE facilite o desenvolvimento de crises, ainda que não seja totalmente compreendido, há evidências de que a albumina seja um elemento importante para este processo (HEINEMANN et al, 2012). Nos últimos

anos tem sido descrito que a ativação da via acoplada ao receptor do fator transformante de crescimento beta (TGF- β) em astrócitos seria um fator desencadeante de inflamação no SNC, e que a sua ativação em neurônios poderia desencadear mecanismos moleculares que culminassem em plasticidade sináptica, aumento da excitabilidade e epileptogênese. De fato, a albumina sérica se liga a receptores para TGF- β , e ativa estes receptores (IVENS et al, 2007; HEINEMANN et al, 2012).

Assim, tem sido proposto que as crises estão diretamente associadas a alterações inflamatórias na vasculatura do SNC, as quais podem intensificar a adesão de leucócitos circulantes, amplificar o dano vascular, e consequentemente ativar mecanismos relacionados à glia e aos neurônios, determinando a epileptogênese. Entre estes estariam uma expressão diminuída de canais de potássio, de junções oclusivas, e de transportadores de glutamato (HEINEMANN et al, 2012).

Zattoni e colaboradores (2011) avaliaram a infiltração de leucócitos em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal (injeção intrahipocampal de ácido caínico em camundongos). Os autores observaram que a ruptura da BHE e a neurodegeneração hipocampal induzida pelo ácido caínico foi acompanhada de expressão sustentada de ICAM-1, ativação da micróglia e grande infiltração de células CD3+. Além disso, a infiltração de macrófagos foi observada, seletivamente no giro denteadoo. Esses dados corroboram com a literatura e sugerem um forte impacto das crises sobre a permeabilidade da BHE.

Enquanto os leucotrienos facilitam a ruptura da BHE, o tratamento com montelucaste, agonista inverso dos receptores CysLT1, previne essa ruptura em modelos experimentais de traumatismo crânio-encefálico (BIBER et al., 2009) e isquemia cerebral focal (ZHAO et al., 2011). Além disso, em animais com encefalomielite auto-imune – modelo com similaridade patológica à esclerose múltipla – o tratamento com montelucaste efetivamente previne a infiltração de células inflamatórias no SNC (WANG et al., 2011). Um efeito protetor similar foi observado em modelo de meningite bacteriana por *Cryptococcus neoformans*, no qual o tratamento com montelucaste previu a penetração de bactérias dentro do encéfalo (KIM, 2009). Recentemente foi sugerido que parte do efeito anticonvulsivante dos glicocorticoides em crianças com epilepsia resistente ao tratamento de diversas etiologias, estaria relacionado à manutenção da barreira

hematoencefálica (MARCIH et al., 2011). Embora o tratamento com montelucaste sistêmico diminua as crises induzidas por pilocapina de maneira dose-dependente, bem como a epileptogênese que se segue ao *status epilepticus* induzido por este agonista muscarínico (REHNI e SINGH, 2011), não foi investigado se este efeito do montelucaste é, de fato, mediado pelo bloqueio dos receptores CysLT. Além disso, até o momento, nenhum estudo investigou, de forma sistemática, se os antagonistas de receptores para leucotrienos diminuem as crises induzidas por pentilenotetrazol, tampouco se tal efeito está relacionado à manutenção da barreira hematoencefálica. Tais questionamentos são absolutamente essenciais para propor os receptores para leucotrienos como alvos possíveis no desenvolvimento de fármacos para o controle de crises. Mais do que isso, em se confirmando o potencial anticonvulsivante desta classe de compostos, sua aplicação na prática clínica poderia ser imediata, visto que o montelucaste, agonista inverso dos receptores CysLT1, é uma droga aprovada para uso em humanos e apresenta poucos efeitos adversos (AMLANI et al., 2011).

1.1.4.1.1 Na⁺,K⁺-ATPase

Em 1957, Jens Cristian Skou descobriu a Na⁺,K⁺-ATPase e propôs o seu papel na extrusão activa do Na⁺ da célula nervosa (SKOU e ESMAN 1992). A Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) pertence à família das ATPases do tipo P, agindo como transportador de íons Na⁺ e K⁺ usando a hidrólise do ATP como substrato. A Na⁺,K⁺-ATPase também é conhecida como bomba de Na⁺ e K⁺, e é responsável pela manutenção dos gradientes desses íons através da membrana da célula (SKOU E ESMAN, 1992; HORISBERGER, 2004). Essa enzima hidrolisa o ATP em ADP e Pi, enquanto bombeia Na⁺ para o exterior e K⁺ para o interior da célula contra os respectivos gradientes eletroquímicos (KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2004).

Durante cada ciclo de transporte, três íons de sódio e dois íons de potássio são translocados através da membrana plasmática. Por conseguinte, esta bomba apresenta ação eletrogênica, contribuindo para aumentar a amplitude do potencial de membrana da célula. A Na⁺,K⁺-ATPase apresenta um mecanismo de ação que envolve dois estados conformacionais, denominados por E1 e E2. Estas duas

conformações, além de exibirem diferentes afinidades de ligação ao Na⁺, K⁺, ATP e outros ligantes, diferem na exposição dos locais de ligação de Na⁺ e K⁺ aos espaços intra e extracelulares (Figura 12).

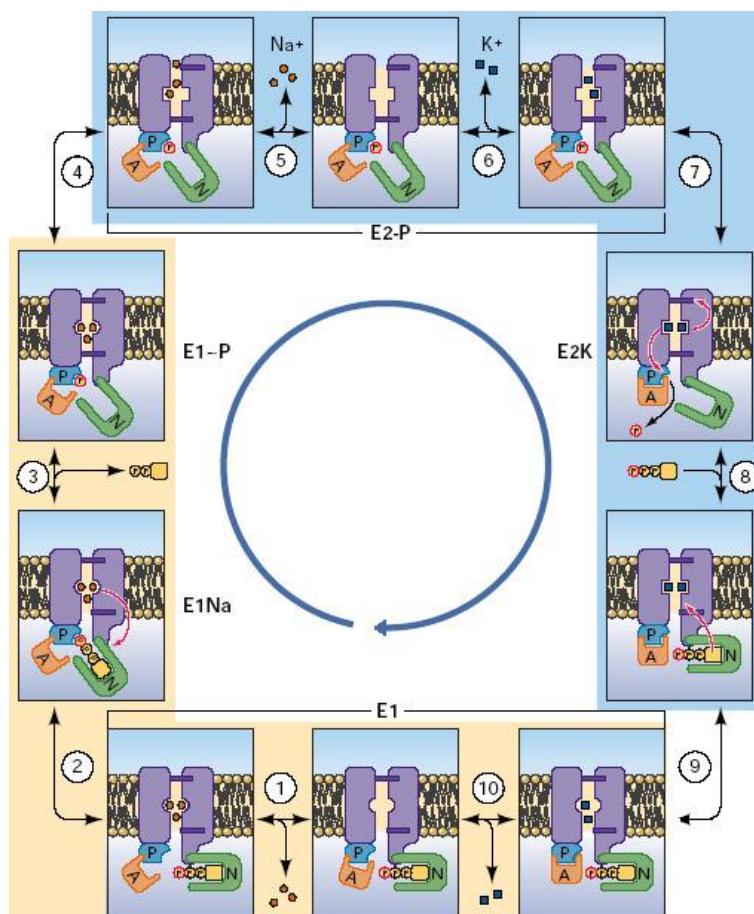


Figura 12 – Representação esquemática do ciclo de transporte iônico pela enzima Na⁺,K⁺-ATPase.

Fonte: Adaptado de Horisberger, 2004.

O primeiro passo do ciclo consiste na ligação de três íons sódio aos sítios de alta afinidade para estes íons. A enzima hidrolisa ATP, ocorrendo a fosforilação de um resíduo de aspartato no segmento intracelular da cadeia polipeptídica, e consequente formação do estado (Na₃)E1-P. Em seguida, ocorre a transição para a conformação E2-P(Na₃), acompanhada da liberação dos íons sódio para o espaço extracelular. Durante esta fase, a afinidade dos sítios de ligação de K⁺ expostos ao espaço extracelular aumenta. Dois íons potássio, então, ligam-se à enzima formando o estado E2-P(K₂). A ligação de K⁺ à enzima é seguida pela sua desfosforilação, ou

seja, estado E2(K₂) e consequente translocação dos íons de potássio para o interior da célula. A liberação dos íons de K⁺ para o espaço intracelular é favorecida pela ligação de ATP, levando, assim, à transição para a conformação E1 (KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2004).

A Na⁺,K⁺-ATPase é principal responsável pela reposição e manutenção dos gradientes eletroquímicos de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática e, por conseguinte, a sua atividade é fundamental para assegurar a repolarização celular, permitindo a volta para a condição de repouso (CLAUSEN, 2003; HORISBERGER, 2004). Além disso, Na⁺,K⁺-ATPase atua também como receptor de sinais gerados por outras proteínas e moléculas não-proteicas, e interage com várias vias de sinalização intracelular, como por exemplo as mediadas por ERK1/2 e cálcio intracelular (HOLMGREN, 2000; HORISBERGER, 2004)

A Na⁺,K⁺-ATPase é composta por duas subunidades polipeptídicas obrigatórias, a subunidade catalítica α e uma subunidade regulatória β. Pode ainda conter uma terceira subunidade, não obrigatória, a subunidade proteolipídica γ, que pertence à família FXYD, tendo também um papel regulador (LINGREL et al., 2003; CLAUSEN, 2003; GEERING, 2006) (Figura 13).

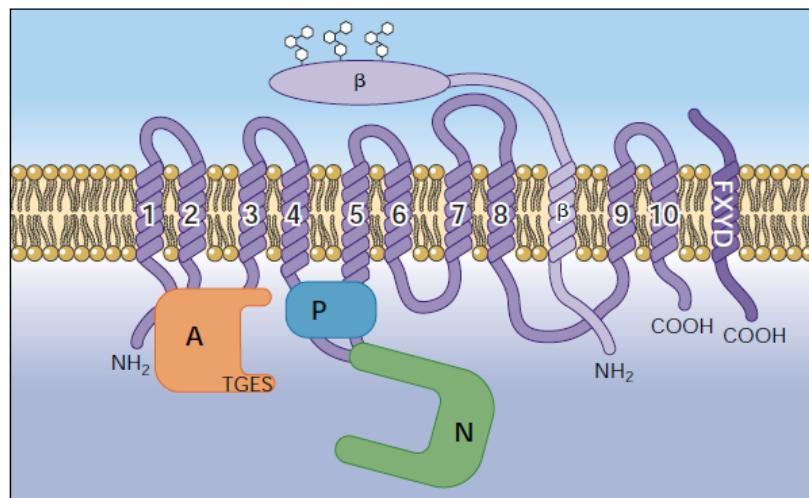


Figura 13 – Esquema representativo da estrutura da Na⁺,K⁺-ATPase.

Fonte: Adaptado de Horisberger, 2004.

A subunidade α possui 10 segmentos transmembrana. Grande parte da cadeia α, incluindo o centro catalítico, forma um domínio de localização

citoplasmática entre o quarto e o quinto segmento transmembrana. A subunidade β está, na sua maior parte, exposta ao exterior da célula. Assim como a subunidade β , a subunidade γ atravessa a membrana plasmática (HORISBERGER, 2004).

Entre os muitos fatores capazes de alterar a capacidade catalítica da enzima, a própria composição em subunidades condiciona a afinidade aos íons Na^+ e K^+ e ao ATP, bem como a sensibilidade a inibidores específicos. Existem 4 isoformas conhecidas da subunidade α (α_1 , α_2 , α_3 , α_4), enquanto que da subunidade β existem apenas 3 (β_1 , β_2 , β_3) (KAPLAN, 2002; GEERING, 2006).

A subunidade α é transmembrana e contém os locais de ligação do Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , ATP e glicosídeos cardíacos, uma classe de compostos naturais, que engloba inibidores específicos da Na^+, K^+ -ATPase (LINGREL et al., 2003). A subunidade α_1 é expressa em todos os tecidos. As restantes isoformas apresentam um padrão de expressão distinto. Enquanto que a subunidade α_2 é abundante no músculo esquelético, coração, cérebro, tecido adiposo, músculo liso vascular e tecido ocular, a subunidade α_3 é encontrada quase que, exclusivamente, nos ovários e nos neurônios, podendo também ser encontrada em leucócitos e células cardíacas de algumas espécies (LINGREL et al., 2003; DOSTANIC-LARSON et al, 2006). A subunidade α_4 é especificamente sintetizada durante a espermatogênese (SHAMRAJ et al, 1994; DOSTANIC-LARSON et al, 2006). Além disso, a subunidade α contém os sítios para fosforilação por PKA (serina 943 em α_1 - α_3) e PKC (serina 23 em α_1), alvos importantes para regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da Na^+, K^+ -ATPase (SHAMRAJ et al, 1994; DOSTANIC-LARSON et al, 2006, HORISBERGER, 2004, APERIA, 2012)

A subunidade β tem um papel fundamental na maturação estrutural e funcional da subunidade catalítica α . Sabe-se que a subunidade β tem duas funções principais: é responsável pela elevada afinidade pelos cátions e protege a subunidade α contra a degradação celular por proteólise (HORISBERGER, 2004; APERIA, 2012).

1.1.4.1.2 Alterações na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase

Entre os vários mecanismos envolvidos na regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, o principal deles é a variação na concentração dos substratos Na^+ , K^+ e

ATP. Pequenas variações na concentração intracelular de Na⁺ afetam de forma crucial o funcionamento da enzima, por outro lado mudanças na concentração de K⁺ afetam a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de forma bem menos intensa. O íon K⁺ pode agir como um antagonista competitivo pelos sítios de ligação do Na⁺ na Na⁺,K⁺-ATPase (THERIEN e BLOSTEIN, 2000). Além da concentração dos seus substratos, a Na⁺,K⁺-ATPase também é regulada pela fosforilação de resíduos específicos de aminoácidos, principalmente os que compõe a subunidade α. Diversas substâncias podem promover essa fosforilação, entre elas, hormônios, neurotransmissores e mediadores inflamatórios. Os mecanismos pelos quais essa fosforilação altera a atividade da enzima são distintos, e vão desde alterações no padrão de afinidade pelos seus substratos à indução da internalização da enzima, de forma célula/tecido-dependente (HORISBERGER, 2004; THERIEN e BLOSTEIN, 2000).

Gonçalves-de-Albuquerque e colaboradores (2013) investigaram a relação entre a inibição da Na⁺,K⁺-ATPase e a lesão pulmonar induzida por ácido oleico em camundongos, e observaram que a Na⁺,K⁺-ATPase pulmonar foi completamente inibida pela administração de 10 µmol de ácido oleico. Essa mesma dose induziu ainda edema pulmonar, influxo de células inflamatórias e aumento da produção de leucotrieno B4 e prostaglandina E2. Por outro lado, Sloniewsky e colaboradores (2004) mostraram que o leucotrieno D4 foi capaz de aumentar a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em células epiteliais alveolares de pulmões de ratos. Medida em 1 e 5 minutos após a exposição ao LTD4, a atividade da enzima esteve aumentada cerca de 14 e 31%, respectivamente. E esse aumento foi acompanhado pelo recrutamento da subunidade α para o compartimento intracelular da membrana basolateral.

A regulação da Na⁺,K⁺-ATPase tem sido investigada em diversos tecidos, assim como o envolvimento da cascata do ácido araquidônico nessa regulação. Em vista disso, Singh e colaboradores (2012) avaliaram se o ácido araquidônico poderia inibir a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase presente na vasculatura pulmonar, bem como o possível mecanismo envolvido. Para isso, a atividade funcional da enzima foi estudada em termos de relaxação induzida pelo potássio em anéis de artéria pulmonar de ovinos, contraídas com solução livre de potássio. Assim, os autores observaram que o ácido araquidônico causou inibição do relaxamento de forma concentração-dependente, o que mostra diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Por outro lado, o ácido nordihidroguaiarético (NDGA), potente inibidor da 5-

lipoxigenase, restaurou, pelo menos, parcialmente, o prejuízo no relaxamento induzido pelo ácido araquidônico. Além disso, a estaurosporina, inibidor da PKC, reverteu completamente o efeito inibitório sobre o relaxamento. Esses achados sugerem o envolvimento da PKC na inibição da Na⁺,K⁺-ATPase pelo ácido araquidônico em anéis de artéria pulmonar de ovinos.

Uma vez que os metabólitos e o ácido araquidônico estão entre os reguladores endógenos da Na⁺,K⁺-ATPase, o efeito direto da lipoxigenase sobre a atividade da enzima foi avaliado, *in vitro*, usando lipoxigenase de soja. O tratamento da Na⁺,K⁺-ATPase renal com 4.2 microg/mL de lipoxigenase de soja causou inibição de, aproximadamente, 20% na atividade da enzima. Além disso, aumentando essa concentração em 10 vezes, a inibição chegou a 30%. Por outro lado, na presença de fenidona, inibidor da lipoxigenase, essa inibição foi bloqueada, e um aumento na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi observado. Além disso, a presença da lipoxigenase intensificou a inibição da enzima causada pela ouabaína. Assim, esses dados sugerem que a lipoxigenase pode modular a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (KUMARATHASAN e LEENEN, 2000; OZKAN et al., 2010).

Além do envolvimento da lipoxigenase, alguns autores tem investigado o papel dos receptores CysLT sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Nesse sentido, Ozkan e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do montelucaste, agonista inverso dos receptores CysLT1, em modelo de pancreatite aguda em ratos. A pancreatite causou diminuição nos níveis teciduais de glutationa bem como na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pancreática, que foi acompanhada de um aumento significativo nos níveis de malondialdeído, mieloperoxidase e citocinas plasmáticas. Por outro lado, o pré-tratamento com montelucaste reverteu, não só as alterações bioquímicas, como também a diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzida pela ceruleína. Esses resultados sugerem que os leucotrienos cisteínicos podem estar envolvidos na patogênese da pancreatite aguda, e que o montelucaste pode ter valor terapêutico para o tratamento dessa condição.

De fato, em modelo de criolesão encefálica induzida por sonda metálica resfriada em nitrogênio líquido, a expressão dos receptores CysLT1 apresentou-se aumentada cerca de 4 a 6 horas após a lesão, e apareceram expressos, basicamente em neurônios. Enquanto isso, o pré-tratamento com pranlucaste, antagonista CysLT1, atenuou a lesão, tanto em doses múltiplas, quanto em uma

única dose. Além disso, o tratamento pós-lesão com uma única dose 30 minutos após a lesão também foi efetivo (DING et al., 2007).

No contexto do envolvimento dos metabólitos do ácido araquidônico como importantes reguladores da Na⁺,K⁺-ATPase, Li e colaboradores (2000) evidenciaram que ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE) – metabólito da 12-lipoxigenase – é capaz de inibir a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase dos túbulos renais de ratos, de maneira dependente da PKC, e que, essa diminuição pode ser bloqueada pela baicaleína, inibidor da 12-LOX. Esses achados corroboram com a literatura que evidencia o envolvimento das lipoxigenases e seus derivados na regulação da Na⁺K⁺-ATPase (KUMARATHASAN e LEENEN, 2000).

No encéfalo, a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase contribui de maneira vital para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável tanto pelos potenciais de repouso e ação quanto da captação/liberação de neurotransmissores (SKOU e ESMAN, 1992). Alterações na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase afetam o padrão de sinalização celular via neurotransmissores e, consequentemente, a atividade neuronal, assim como o comportamento (MOSELEY et al., 2007). Dessa forma, um prejuízo ao funcionamento da Na⁺,K⁺-ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR et al., 1986).

Xiong e Stringer (2000) realizaram um estudo avaliando possíveis mecanismos regulatórios durante crises recorrentes espontâneas induzidas por perfusão de potássio no giro denteadoo de ratos. Os autores sugerem que o principal fator regulador nesse modelo parece ser a Na⁺,K⁺-ATPase, principalmente neuronal. Além disso, Vaillend e colaboradores (2002) mostraram que a inibição parcial da Na⁺,K⁺-ATPase produz hiperexcitabilidade neuronal na região CA1 do hipocampo. Os autores sugerem que tal efeito seja atribuído a redução dos potenciais GABAérgicos com concomitante aumento dos potenciais excitatórios pós-sinápticos.

Além disso, tem sido evidenciado que o SE induzido por pilocarpina em ratos em desenvolvimento causa aumento na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo, com consequente aumento da hiperexcitabilidade (REIME KINJO et al., 2007). Por outro lado, tem sido evidenciado que a prostaglandina E2 potencializa as crises induzidas por metilmalonato em ratos (SALVADORI et al., 2012), ao passo que diminui a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo (Oliveira et

al., 2009). Nesse sentido, Foley e colaboradores (1997) investigaram o efeito de produtos hidroperóxidos da cascata ácido araquidônico (5-, 12-, e 15-HPETE, derivados a partir da 5-, 12-, e 15-LOX, respectivamente) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. O 5-HPETE, precursor dos leucotrienos cisteínicos, inibiu cerca de 67% a atividade da enzima. Por outro lado, 12- e 15-HPETE não apresentaram o mesmo efeito. Esses achados sugerem que a produção de 5-HPETE pela 5-LOX e a subsequente inibição da Na⁺,K⁺-ATPase neuronal pode ser um mecanismo modulador da transmissão sináptica.

A inibição da Na⁺,K⁺-ATPase em nível pré-sináptico prejudica o gradiente de sódio, que é responsável pela recaptAÇÃO de diversos neurotransmissores, isso resulta no bloqueio dessa recaptAÇÃO, e, por conseguinte, leva a estimulação da liberação de glutamato e outros neurotransmissores, os quais modulam a excitotoxicidade (KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2014).

Uma vez que diversas doenças neurológicas inflamatórias estão associadas com aumento da permeabilidade da BHE, estudos recentes têm sugerido que Na⁺,K⁺-ATPase também pode afetar a permeabilidade paracelular através da BHE, uma vez que pode modular as junções de oclusão, funcionando como tradutor de sinais, independente da sua função como bomba iônica. Assim, tem sido evidenciado que uma diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, induzida por baixas concentrações de ouabaína, aumenta a expressão de ocludinas, ao passo que altas concentrações desse inibidor aumentam a permeabilidade paracelular, com concomitante redistribuição de ZO-1 e ocludinas, durante a formação das junções de oclusão em embriões de ratos (VIOLETTE et al., 2004). Nesse sentido, Giannatselis e colaboradores (2011) evidenciaram que baixas concentrações de ouabaína reduzem a fosforilação da SRC, proteína quinase da família da SFK, cuja fosforilação é fundamental para regulação das junções de oclusão em embriões de ratos. Por outro lado, altas concentrações de ouabaína aumentaram a fosforilação dessa proteína, sugerindo um papel modulatório da Na⁺,K⁺-ATPase sobre a formação das junções de oclusão.

Assim, os autores inferem que a Na⁺,K⁺-ATPase pode funcionar como uma proteína de suporte, e que, a interação dela com outras proteínas em tecidos específicos, pode regular a permeabilidade paracelular, embora o exato mecanismo molecular, responsável por esse evento, ainda não tenha sido esclarecido.

2 JUSTIFICATIVA

Em virtude do elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam crises refratárias aos fármacos disponíveis, a busca por novas terapias anticonvulsivantes torna-se salutar. Para isso, faz-se necessário aprofundar o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção das crises epilépticas.

Neste sentido, considerando a clara associação entre a presença de um processo inflamatório no sistema nervoso central e o aumento da excitabilidade neuronal, a qual culmina com a crise epiléptica, o presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento de um tipo de mediador inflamatório, os leucotrienos cisteínicos, bem como de seus receptores (CysLT) nas crises induzidas por PTZ, um modelo experimental já bem estabelecido na literatura e de alto valor preditivo na clínica para o desenvolvimento de novos agentes com potencial anticonvulsivante.

Nos últimos anos, um número significativo de estudos tem proposto o envolvimento dos leucotrienos cisteínicos em diversas doenças do SNC. Um aumento da produção de leucotrienos, bem como a ativação dos receptores CysLT têm sido associados a um efeito prejudicial na excitabilidade cerebral, como ocorre, por exemplo, no trauma crânioencefálico (FARIAS et al, 2009), na encefalite (ZHU et al, 2010), na doença de Parkinson (CHOU et al., 2013), na isquemia (ELSHAZLY et al; 2013, ZHANG et al, 2013), na dor neuropática (ZHOU et al, 2014) e na epilepsia (REHNI e SINGH, 2011; LENZ et al., 2014), entretanto, os mecanismos que mediam essa ação não estão totalmente esclarecidos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de receptores para leucotrienos cisteínicos (CysLT) nas crises induzidas por PTZ e na permeabilidade da BHE em camundongos, bem como investigar envolvimento desses receptores na atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase como um possível mecanismo de ação.

3.1 Objetivos específicos – Parte I

- Verificar o efeito de antagonistas para receptores CysLT1/2 sobre as crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Verificar o efeito de agonista seletivo de receptores CysLT1 sobre as crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Verificar se o uso de agonista seletivo para receptores CysLT1 reverte a ação do antagonista seletivo nas crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Avaliar o efeito de antagonista seletivo para receptores CysLT1 sobre a permeabilidade da BHE nas crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Avaliar o efeito de agonista seletivo para receptores CysLT1 sobre a permeabilidade da BHE nas crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Avaliar se o uso do agonista seletivo para receptores CysLT1 reverte o efeito do agonista CysLT1 sobre a permeabilidade da BHE nas crises induzidas por PTZ em camundongos;
- Avaliar se alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica são acompanhadas de alterações na imunorreatividade aos receptores CysLT.

3.1.1 Objetivos específicos – Parte II

- Avaliar o efeito da incubação com leucotrieno D4 (LTD4) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;

- Determinar o efeito do LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em homogeneizado total de hipocampo de camundongos.
- Verificar o efeito do LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo incubadas com anticorpo anti-CysLT1;
- Verificar o efeito da administração i.c.v. de LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em homogeneizado total de hipocampo de camundongos, ex vivo.
- Avaliar o efeito da incubação com montelucaste sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;
- Verificar se a incubação com montelucaste reverte a ação do LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;
- Determinar o efeito do inibidor da PKC (GF-109203X) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos.
- Verificar se a incubação com inibidor da PKC (GF-109203X) inibe a ação do LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;

3.2 Apresentação

O presente trabalho consiste na apresentação dos resultados obtidos sob a forma de ARTIGOS CIENTÍFICOS, que contêm os MANUSCRITOS I e II, correspondentes as Partes I e II da Tese de Doutorado. Em cada manuscrito encontram-se as respectivas seções: INTRODUÇÃO, MATERIAIS e MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO e REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS. Com a finalidade de integrar e discutir os resultados dos MANUSCRITOS I E II, uma nova seção DISCUSSÃO é apresentada. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS correspondem somente às citações realizadas nas seções da tese, exceto ARTIGOS CIENTÍFICOS.

O MANUSCRITO I foi publicado na revista Neuroscience (ISSN: 0306-4522, Fator de Impacto 3.458).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Manuscrito I

Original paper

Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction

Quéli Fernandes Lenz^{1,2}, Daniela Soledad Arroyo³, Alice Bertotto Poersch¹, Cíntia Junia Masson¹, Ana Cláudia Jesse¹, Joseane Righes Marafiga¹, Cristina Ruedell Reschke^{1,2} Pablo Iribarren³, Carlos Fernando Mello^{1,2}.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia¹,
 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia², Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil
 Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET)³
 Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas
 Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Corresponding author:

Dr. Carlos Fernando Mello

Dep. Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
 97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL.
 FAX: +55 55 3220 9378
 e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br
 mello.cf@gmail.com (alternative)

Abstract

Current evidence suggests that inflammation plays a role in the pathophysiology of seizures. In line with this view, selected pro-inflammatory arachidonic acid derivatives have been reported to facilitate seizures. Kainate-induced seizures are accompanied by leukotriene formation, and are reduced by inhibitors of LOX/COX pathway. Moreover, LTD4 receptor blockade and LTD4 synthesis inhibition suppress pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and pilocarpine-induced recurrent seizures. Although there is convincing evidence supporting that blood-brain-barrier (BBB) dysfunction facilitates seizures, no study has investigated whether the anticonvulsant effect of montelukast is associated with its ability to maintain BBB integrity. In this study we investigated whether montelukast and other CysLT receptor antagonists decrease PTZ-induced seizures, as well as whether these antagonists preserve BBB during PTZ-induced seizures. Adult male albino Swiss mice were stereotactically implanted with a cannula into the right lateral ventricle, and two electrodes were placed over the parietal cortex along with a ground lead positioned over the nasal sinus for electroencephalography (EEG) recording. The effects of montelukast (0.03 or 0.3 nmol/1 μL, i.c.v.), pranlukast (1 or 3 nmol/1 μL, i.c.v.), Bay u-9773 (0.3, 3 or 30 nmol/1 μL, i.c.v.), in the presence or absence of the agonist LTD4 (0.2, 2, 6 or 20 pmol/1 μL, i.c.v.), on PTZ (1.8 nmol/2 μL)-induced seizures and BBB permeability disruption were determined. The animals were injected with the antagonists, agonist or vehicle 30 min before PTZ, and monitored for additional 30 min for the appearance of seizures by electrographic and behavioral methods. BBB permeability was assessed by sodium fluorescein method and by confocal microscopy for CD45 and IgG immunoreactivity. Bay-u9973 (3 and 30 nmol), montelukast (0.03 and 0.3 nmol) and pranlukast (1 and 3 nmol), increased the latency to generalized seizures and decreased the mean amplitude of EEG recordings during seizures. LTD4 (0.2 and 2 pmol) reverted the anticonvulsant effect of montelukast (0.3 nmol). Montelukast (0.03 and 0.3 nmol) prevented PTZ-induced BBB disruption, an effect that was reversed by LTD4 at the dose of 6 pmol, but not at the doses 0.2 and 2 pmol. Moreover, the doses of LTD4 (0.2 and 2 pmol) that reverted the effect of montelukast on seizures did not alter montelukast-induced protection of BBB, dissociating BBB protection and anticonvulsant activity. Confocal microscopy analysis revealed that 1. PTZ increased the number of CD45+ and double-immunofluorescence staining for CD45 and IgG cells in the cerebral cortex, indicating BBB leakage with leukocyte infiltration; 2. while LTD4 (6 pmol) potentiated, montelukast decreased the effect of PTZ on leukocyte migration and BBB, assessed by doubleimmunofluorescence staining for CD45 and IgG cells in the cannulated hemisphere. Our data do not allow us ruling out that mechanisms unrelated and related to BBB protection may co-exist, resulting in decreased seizure susceptibility by montelukast. Notwithstanding, they suggest that CysLT1 receptors may be a suitable target for anticonvulsant development.

Key words: leukotrienes, pentylenetetrazole, seizure, CysLT1R, montelukast.

Introduction

Growing clinical and experimental evidence suggests that inflammation plays an important role in the pathophysiology of epilepsy (Vezzani, 2005, Vezzani and Friedman, 2011, Walker and Sills, 2012; Jimenez-Mateos and Henshall, 2013). In line with this view, selected proinflammatory cytokines decrease seizure threshold and/or prolong it. For instance, (IL)-1 β receptor antagonist reduces seizures in various experimental models and preventing IL-1 β increase blocks kindling development in rats (Balosso et al., 2008, Maroso et al., 2011). Moreover, mice expressing high levels of IL-6 present severe neurologic disease characterized by runting, tremor, ataxia, and seizures, supporting the view that cerebral overexpression of IL-6 may precipitate convulsions (Campbell et al., 1993).

Interestingly, Nur and colleagues (2012) have shown an association between interleukin-6 single-nucleotide polymorphisms and febrile seizures in children. Pro-inflammatory effects of cytokines include increased expression of rate-limiting enzymes of metabolic pathways involved in the synthesis of inflammatory mediators, such as cyclooxygenase-2, which is the rate limiting enzyme in the prostaglandin and tromboxane synthesis pathway (Vane et al., 1998). In fact, increasing evidence suggests that COX-2 derived eicosanoids play a role in seizures and epilepsy (Vezzani, 2005, Oliveira et al., 2008), since pharmacological treatments that increase COX-2 expression, such as interleukin (IL)-1 β facilitate bicuculline- and pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures (Vezzani et al., 2000, Akarsu et al., 2006).

Accordingly, Oliveira and colleagues (2008) have shown that prostaglandin E2 (PGE2) facilitates PTZ-induced seizures, and that selective antagonists for EP1, EP3 and EP4 receptors increase the latency to clonic and generalized tonic-clonic seizures induced by this GABAa antagonist in rats. Also in line with this view, Salvadori and colleagues (2012) have shown that PGE2 may precipitate and exacerbate methylmalonate-induced seizures. Since EP1, EP3 and EP4 receptor antagonists were more effective than COX-2 inhibitors to decrease PTZ-induced seizures, we have hypothesized that the 5-LOX pathway and its products, leukotrienes, might be involved in the development of seizures. In fact, lipoxygenase pathways, including the 5, 12, 15-LOX pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism have been identified either by *in vitro* or by *ex vivo* studies in cerebral tissue (Simmet and Tippler, 1990, Hedi and Norbert, 2004) and implicated in the

pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease (Chou et al., 2013) and epilepsy (Rehni and Singh, 2011).

In the CNS, 5-LOX is expressed in neurons, astrocytes and oligodendrocytes in various regions of the brain, with the most prominent expression in the cortex, hippocampus and the cerebellum (Manev et al., 1998, Hedi and Norbert, 2004, Brock, 2005). The main stable products of the 5-LOX pathway, LTC4 and LTD4 are potent chemotactic factors that increase white blood cells diapedesis (Lewis et al., 1990, Fabene et al., 2008) and vascular permeability, including of the blood-brain barrier (Wang et al., 2006). Moreover, it has been shown that kainate-induced seizures are accompanied by time-dependent leukotriene formation. Both leukotriene production and seizures are reduced by phenidone and BW755C, dual inhibitors of LOX/COX pathway, suggesting that leukotrienes play a role in seizures (Simmet and Tippler, 1990, Kim et al., 2000). In line with this view, Rehni and Singh (2011) have shown that montelukast, a CysLT1 receptor inverse agonist (Dupré et al., 2004), and 1,2,3,4, tetrahydroisoquinoline, a LTD4 synthetic pathway inhibitor, dose-dependently suppress the development of kindled seizures, as well as pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures.

Recent studies have described an increased number of spontaneous seizures in animals with more prominent BBB dysfunction following pilocarpine-induced status epilepticus, suggesting a potential direct role for BBB dysfunction in epileptogenesis (Oby and Janigro, 2006, van Vliet et al., 2007; Badawy et al., 2012). Indeed, there is clinical and experimental evidence suggesting that BBB dysfunction triggers corollary events that may lead to epilepsy (Friedman et al., 2009, Friedman, 2011, Heinemann et al., 2012). It has also been shown that montelukast prevents BBB disruption in a rat model of traumatic brain injury (Biber et al., 2009) and focal cerebral ischemia (Zhao et al., 2011). Moreover, in experimental autoimmune encephalomyelitis animals, a model with pathological similarities to multiple sclerosis, montelukast effectively blocks the CNS infiltration of inflammatory cells (Wang et al., 2011). A similar protective effect was observed in a model of bacterial meningitis by *Cryptococcus neoformans*, in which treatment with montelukast prevented penetration of bacteria into the brain (Kim et al., 2009). However, no study has systematically investigated whether the anticonvulsant effect of the montelukast is associated with maintenance of BBB integrity. Therefore, in this study we investigated whether montelukast and

other CysLT receptor antagonists decrease seizures induced by PTZ, as well as whether these antagonists preserve BBB during PTZ-induced seizures.

Experimental Procedures

Reagents

Pentylenetetrazol and sodium fluorescein were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Montelukast (CysLT1R inverse agonist) and pranlukast (CysLT1R selective antagonist), Bay-u9973 (CysLT1/2R dual antagonist) and LTD4 (CysLTR agonist) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Anti-CD45 antibodies were purchased from Biolegend, San Diego, CA, USA and anti-IgG antibodies from Invitrogen, Carlsbad, CA. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 secondary antibodies from purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA. Montelukast was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in apyrogenic sterile saline, in such a way that DMSO concentration did not exceed 0.5%. Pranlukast was dissolved in sterile apyrogenic saline. Bay-u9973 and LTD4, supplied as a solution in ethanol, were diluted in sterile apyrogenic saline in such a way that ethanol concentration did not exceed 1%. All other reagents were of analytical grade and purchased from local suppliers.

Animals

Adult male Swiss mice (from the animal house of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil) weighing 25 ± 3.5 g were used. The animals were kept under standard conditions of temperature and humidity (12h light/dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food and water. Animals were habituated to laboratory conditions 24 h before each experiment. Experiments were performed between 09:00 and 17:00 hours. The experimental protocol was approved by Institutional Animal Ethics Committee and conducted according with policies of National Institutes of Health Guide for the care and use Laboratory Animals (Nº 69/2010). Experimental protocols were designed that aimed to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering (n=4-7 per group).

Surgery

Animals were anesthetized with ketamine/xylazine (50/5 mg/kg, i.p.) and a cannula was inserted into the right lateral ventricle (coordinates relative to bregma:

L= +0.9, V= -1.6) (Paxinos and Franklin, 2001) with a stereotaxic device. Two electrodes were placed over the parietal cortex along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes and the cannula were fixed to the skull with dental acrylic cement. Ceftriaxone (100 mg/kg, i.p.) and meloxicam (2 mg/Kg, i.p.) were administrated immediately before the surgical procedure. The experiments were performed 7 days after surgery.

Experimental protocol and EEG recording

The effect of the CysLTR negative modulators on PTZ (1.8 $\mu\text{mol}/2\mu\text{L}$ i.c.v.)-induced seizures was investigated by injecting the animals with montelukast (0.03 or 0.3 $\mu\text{mol}/1\mu\text{L}$, i.c.v.), pranlukast (1 or 3 $\mu\text{mol}/1\mu\text{L}$, i.c.v.), the partial agonist Bay u-9773 (0.3, 3 or 30 nmol/1 μL , i.c.v.) or with its respective vehicle (0.5% DMSO in saline or 0.5% ethanol in saline). The effect of LTD4 (0.2 nmol/1 μL or 2 nmol/1 μL , i.c.v.) or its respective vehicle (0.5% ethanol in saline) on PTZ-induced seizures was also investigated. Drug doses and time between injections were selected based on previous pilot experiments or dose-effect curves. All i.c.v. injections were performed over a 1-min period by using a 30 gauge needle protruding 1 mm below the guide cannula connected to a Hamilton syringe by PE10 tubing. An additional minute was allowed before removal of the needle to avoid backflow of drug through the cannula. Briefly, the animals were allowed to habituate to a plexiglas cage (25 cm \times 25 cm \times 60 cm) for at least 20 min before the EEG recordings. The mouse was then connected to the leadsocket in a swivel inside a Faraday's cage. Routinely, a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. The animals were then injected with the antagonist, agonist or vehicle, 30 min before the administration of PTZ (1.8 nmol/2 μl , i.c.v.). After the injection of PTZ, the animals were monitored for additional 30 min for the appearance of seizures, by electrographic and behavioral methods. The behavior of the animals was followed up, and EEG was concomitantly recorded using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neuromap LTDA, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1—70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. EEG recordings were visually analyzed for the appearance of seizure activity. This ictal activity was confirmed by visual observation of behavior. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline);

multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s, ≥ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s). Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded. In addition, the mean amplitude (in μ V) of EEG traces before and after PTZ injection was calculated. Full baseline traces (obtained in the absence of pharmacological treatment) and full traces obtained after the administration of CysLT ligands were used to quantify mean amplitude during the pre-PTZ period. Data were treated as repeated measures in the statistical analysis. Therefore, each mouse was control of itself, correcting for between subjects variability. However, after PTZ injection, only the mean ictal amplitude was considered in the analysis. Specifically, ictal episodes were identified and individually quantified, generating the mean ictal amplitude. If the anticonvulsant activity of montelukast, pranlukast and Bay-u9973 were due to an interaction with CysLTR in the brain, these actions should be reverted by the injection of an agonist (LTD4). We investigated this possibility by injecting the animals with an effective dose of montelukast (0.3 μ mol, i.c.v.) and LTD4, at doses that caused no effect per se on seizures (0.2 or 2 pmol, i.c.v.), 15 min before PTZ (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.). Latency to myoclonic jerks and tonic-clonic generalized seizures were recorded. Mean amplitude and duration of seizure episodes were calculated from EEG recordings.

Blood-brain barrier (BBB) permeability assay

BBB permeability was assessed as described by Morrey et al. (2008). The animals were injected with 10 mg sodium fluorescein in 0.1 ml sterile saline (i.p.). Fifteen minutes thereafter they were injected with montelukast (0.03 or 0.3 μ mol, i.c.v.) or LTD4 (0.2 or 2 pmol). Fifteen minutes after CysLT ligand injection, the mice were injected with PTZ (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.), and observed during 20 min for the appearance of seizures. At the end of the observation period, the animals were anaesthetized with ketamine/xylazine (50/5 mg/kg, i.p.) for ventricular blood collection (cardiac puncture). The blood was centrifuged and serum was stored at -70°C until processing. The brain was perfused with 150 ml of 0.9% NaCl to remove all vascular content, weighed, and each cerebral hemisphere was homogenized in 0.5 ml of sterile PBS, and stored at -80°C until processing. Brain and serum samples were

sequentially diluted in sterile PBS (1:10 v/v) and in 20% TCA (1:10 v/v). Brain samples were centrifuged at 1250 g for 5 min, and the resulting supernatant was diluted in 20% TCA (1:10 v/v). All samples were incubated at -4°C for 24 h and centrifuged at 10.000 g for 15 min to remove precipitated protein. The supernatant was removed and diluted in 1M Tris (pH 10, 1:2 v/v). Fluorescence was measured in a fluorometer (Molecular Devices) using an excitation wavelength of 480 nm, and an emission wavelength of 538 nm. A standard curve for fluorescein quantification in the samples was generated by simultaneously analyzing fluorescein solutions prepared in 10 % TCA and 0.5 M Tris. The degree of BBB permeability was measured as the percentage (w/v) of sodium fluorescein in a gram of brain tissue per the amount of sodium fluorescein in a milliliter of serum, in both hemispheres (Morrey et al., 2008).

Immunofluorescence

Mice were injected with montelukast (0.3 µmol/1 µL, i.c.v.) or LTD4 (2 pmol/1 µL, i.c.v.) and, fifteen minutes thereafter, injected with PTZ (1.8 µmol/2 µL, i.c.v.). The animals were transferred to a clear observation cage and observed during 20 min for the appearance of seizures. At the end of the observation period, mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (50/5 mg/kg, i.p.), and their brain were sequentially perfused with 150 ml of 0.9% NaCl to remove vascular content, and 4% paraformaldehyde. The brains were removed and immersed in sterile 30% sucrose for at least 72 hours and 10 µm sections were incubated with anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA) antibodies. Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546 secondary antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used. After washes with PBS the slides were stained with DAPI for 5 minutes at room temperature. The slides were analyzed under a laser scanning confocal fluorescence microscope (Olympus FV300, Tokyo, Japan) and number of CD45 and CD45/IgG positive cells were determined using the software ImageJ (NIH, USA).

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov (KS) test was used to verify data normality. Latency to myoclonic jerks and to tonic-clonic generalized seizures were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test, since data distribution was not Gaussian. Data are presented as median and interquartile ranges. Mean amplitude data were analyzed by repeated measures ANOVA followed by

Bonferroni's test, and respective data are presented as mean and standard error of the mean. Sodium fluorescein content data were analyzed by a three way ANOVA (pretreatment by treatment by hemisphere), considering the "hemisphere" factor as a within-subject factor (repeated measures). Data were subjected to log transformation before analysis in order to meet the assumptions for ANOVA. Immunofluorescence staining data were analyzed by ANOVA, followed by Bonferroni's test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant, and F and H values are shown only if $p < 0.05$.

Results

Effect of CysLT antagonists on the latency to PTZ-induced seizures

Figure 1 shows the effect of Bay-u9973 (0.3, 3 and 30 nmol, i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{L}$ i.c.v.) measured as latency to myoclonic jerks (isolated myoclonic jerk, with concomitant spike activity in the EEG, Fig. 1A); latency to generalized tonic-clonic seizures (Fig. 1B) and mean amplitude in EEG records (Fig. 1G). Generalized seizures appeared in the EEG recordings as the major seizure activity, and were characterized by 2–3 Hz high-amplitude activity. Statistical analysis (Kruskall—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparisons test) revealed that Bay-u9973 increased the latency to generalized seizures [$H(3)=20.63$; $p<0.001$, Fig. 1B; $n=4-6$ per group], but did not alter the latency to myoclonic jerks (Fig. 1A). PTZ-induced seizures were characterized by the occurrence of multi-spikes plus slow waves and major seizure activity. Multi-spikes plus slow waves coincided with myoclonic jerks. After the ictal discharge, postictal EEG suppression and slow waves were observed, correlating with behavioral catalepsy. Statistical analysis (repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's test) revealed that Bay-u9773 decreased the mean amplitude (in μV) of EEG traces after PTZ administration in the two recording leads, in a 20 min observation period [$F(3,20) = 4.17$; $p<0.01$] (Fig. 1G). Representative ictal EEG recordings of animals treated respectively with vehicle and Bay-u9773 are shown in Figure 1C and 1E.

Since the non-selective CysLT receptor antagonist Bay-u9773 decreased PTZ-induced seizures, we investigated whether the selective CysLT1R antagonist pranlukast (1 and 3 μmol), and the CysLT1R inverse agonist montelukast (0.03 and 0.3 μmol , i.c.v.) decreased the convulsive episodes elicited by PTZ. Figure 2 shows the effect of increasing doses of montelukast on the latency to myoclonic jerks, generalized tonic-clonic convulsions and mean amplitude in EEG records. Statistical

analysis (Kruskall—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test) revealed that montelukast (0.03 and 0.3 µmol) increased the latency to myoclonic episodes (Fig. 2A) [$H(2)=11.94$; $p<0.05$; $n=5-7$ per group] and to generalized seizures (0.3 µmol; Fig. 2B) [$H(2)=13.08$; $p<0.05$]. Figure 2G shows the effect of montelukast (0.03 and 0.3 µmol) on the mean amplitude (in µV) of the electrographic recordings from animals subjected to PTZ-induced seizures. Repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's test of EEG mean amplitude data revealed that montelukast decreased the mean amplitude of ictal EEG recordings [$F(2,15)=5.8$; $p<0.05$]. Representative ictal EEG recordings of animals treated respectively with vehicle and montelukast are shown in Figure 2C and 2E.

The effect of pranlukast on PTZ-induced seizures is shown in Figure 3. Statistical analysis (Kruskall—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test) revealed that pranlukast decreased seizures susceptibility as measured by a significant increase in the latency to PTZ-induced clonic [$H(2)=8.704$; $p<0.05$; Fig. 3A; $n=4-6$ per group] and generalized seizures [$H(2)=10.98$; $p<0.01$; Fig. 3B]. Pranlukast also decreased the mean amplitude (in µV) of ictal EEG recordings [$F(2,15)=6.05$; $p<0.01$ (ANOVA followed by Bonferroni's test), Fig. 3G]. Representative ictal EEG recordings of animals treated respectively with vehicle and pranlukast are shown in Figure 3C and 3E.

Effect of LTD4 on the latency to PTZ-induced seizures

Figure 4 shows the effect of LTD4 (0.2, 2 and 20 pmol, i.c.v.), a selective CysLT1 receptor agonist, on the latency to clonic (A), generalized tonic-clonic seizures (B) induced by PTZ and mean amplitude EEG recordings (C). Statistical analysis (Kruskall—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test) revealed that LTD4 (20 pmol) facilitated PTZ-induced seizures, since it decreased the latency to both the myoclonic behavioral and EEG manifestation (isolated myoclonic jerk, with concomitant spike activity in the EEG) [$H(3)=13.55$; $p<0.01$; Fig. 4A; $n=5-7$ per group] and to generalized tonic-clonic seizures [$H(3)=12.36$; $p<0.01$; Fig. 4B]. Quantitative analysis of EEG recordings is shown in Figure 4G. Statistical analysis (ANOVA followed by Bonferroni's test) revealed that LTD4 increased the mean amplitude (in µV) of EEG recordings of PTZ-induced seizures [$F(3,15)=3.7$; $p<0.01$]. Representative ictal EEG recordings of animals treated respectively with vehicle and LTD4 are shown in Figure 4C and 4E.

Pharmacological treatments did not alter the duration of seizure episodes (or total time spent seizing).

LTD4 reverses the anticonvulsant effect of montelukast

If the anticonvulsant actions of the selective and non-selective CysLTR antagonists were due to a decreased LTD4-CysLT1 receptor activity, their actions should be reverted by the injection of the respective agonist. We investigated this possibility by injecting the animals with montelukast (0.3 µmol, i.c.v.) or vehicle 30 min before PTZ and LTD4 (0.2 or 2 pmol, i.c.v.) or vehicle, 15 min before PTZ (1.8 µmol/2 µL, i.c.v.; Figure 5). Statistical analysis (Kruskall—Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test) revealed that the administration of LTD4 (0.2 and 2 pmol, i.c.v.) reversed the anticonvulsant effect of montelukast (0.3 µmol, i.c.v.), measured by both latency to clonic [$H(3)=15.41$; $p<0.05$; Fig. 5A; $n=5-6$ per group] and generalized tonic–clonic seizures [$H(3)=13.7$; $p<0.05$; Fig. 5B]. The electrographic pattern of the seizures presented by animals injected with LTD4 plus montelukast plus PTZ was very similar to that presented by animals treated only with vehicle plus PTZ. Figure 5C shows that LTD4 reversed the protective effect of montelukast on mean amplitude (in µV) of ictal EEG recordings [$F(5,32)=4.17$; $p<0.01$].

Effect of montelukast and LTD4 on BBB permeability

Since it has been shown that both seizures and leukotrienes increase BBB permeability (Oby and Janigro, 2006; Wang et al., 2006; Qi et al., 2011), we hypothesized that LTD4 might increase PTZ-induced seizures by causing BBB disruption. Figure 6A shows the effect of LTD4 (0.2 and 2 pmol, i.c.v.) on PTZ (1.8 µmol/2 µL, i.c.v.)-induced increase of BBB permeability by the fluorescein method. Statistical analysis revealed a significant pretreatment (vehicle or LTD4) by treatment (vehicle or PTZ) by hemisphere interaction [$F(2,24)=4.09$; $p<0.05$]. Post hoc analysis (Bonferroni's test) revealed that LTD4 (2 pmol, i.c.v.) increased the brain:serum fluorescence ratio compared with animals injected with vehicle-PTZ in the contralateral hemisphere. This result may have occurred because of a ceiling effect, i.e. because it is easier to increase BBB permeability where the barrier is not disrupted. Moreover, one might interpret a smaller effect of LTD4 on the ipsilateral

hemisphere because of an already established local inflammatory reaction, due to cannula placement.

Figure 6B shows the effect of montelukast (0.03 and 0.3 μ mol, i.c.v.) on PTZ-induced BBB disruption. Statistical analysis (three-way ANOVA followed by Bonferroni T-test) revealed that injection of CysLT receptor inverse agonist at the dose of 0.3 μ mol prevented PTZ-induced BBB disruption [$F(2,24)=28.05$; $p<0.001$; $n=6-7$ per group] and a significant effect of hemisphere [$F(1,24)=95.35$; $p<0.001$]. This was due to the presence of the cannula in this hemisphere, which increased local BBB disruption.

LTD4 reverts the protective effect of montelukast on the BBB permeability

Since LTD4 reversed the anticonvulsant effect of montelukast (measured as latency to myoclonic and generalized seizures), we investigated whether LTD4 (0.2 and 2 pmol) reversed the protective effect of montelukast on the BBB permeability. However, since LTD4 at the doses of 0.2 and 2 pmol did not reverse the protective effect of montelukast on BBB (data not shown), we tested whether a high dose of LTD4 (6 pmol) prevented this effect of montelukast. Figure 7 shows that LTD4, at dose of 6 pmol, reverted the protective effect of montelukast on PTZ-induced BBB disruption [significant interaction: $F(1,32)=16.82$, $p < 0.001$; $n = 4-5$ per group]. Figure 8 shows a plot of individual ranked data of brain:serum fluorescence ratio of the ipsilateral hemisphere against respective latency to generalized seizure of the experiments shown in Figures 6 and 7, as well as data not shown from experiments with LTD4 0.2 and 2 pmol. Spearman correlation analysis of data revealed a highly significant correlation ($r=-0.841$, $p<0.0001$) between these parameters, in an individual basis.

Effect of LTD4 and montelukast on the number of infiltrating CD45 and CD45/IgG positive leukocytes in the cerebral cortex

Since BBB permeability experiments with fluorescein showed that LTD4 increased and montelukast decreased BBB leakage, we decided to investigate whether CD45 positive cells increased in the cerebral cortex (that had the cannula implanted), as a measure of leukocyte infiltration. In addition, double staining for CD45 and IgG was performed to label leukocytes and IgG in the cortical parenchyma. Figure 9 (A-G) shows representative images of CD45+ cells in cerebral

cortex. Consistent with BBB permeability experiments, quantitative immunohistochemistry analysis showed a significant reduction in PTZ-induced leukocyte infiltration in mice treated with montelukast, when compared to those that received vehicle. Moreover, LTD4 significantly increased the number of CD45+ cells in the cerebral cortex, confirming that LTD4 facilitates PTZ-induced BBB rupture (Figure 9H) [$F(6,21)=20.67$; $p<0.001$]. Quantitative analysis of double labelled CD45/IgG cells (Figure 10A-G) by confocal microscopy also revealed, as expected, that montelukast decreased leukocyte infiltration and IgG spreading [$F(6,21)=15.99$; $p<0.001$] (Figure 10H). No difference between groups were found in the hemisphere without cannula (data not shown).

Discussion

In the current study we showed that a selective CysLT1 receptor antagonist and a CysLT1 receptor inverse agonist decrease PTZ-induced seizures in mice. In addition, the administration of LTD4, a CysLT1 receptor agonist, decreased the latency to PTZ-induced seizures and reversed the anticonvulsant effect of montelukast. Montelukast and LTD4 respectively reduced and increased the BBB disruption induced by PTZ. Notwithstanding, the dose of LTD4 required to antagonize the protective effects of montelukast on the BBB was thirty times higher than the dose required to antagonize the anticonvulsant effect of montelukast. Leukotrienes, first identified by Samuelsson (1979), are eicosanoid inflammation mediators that have been implicated in lesion/injury resolution, airway anaphylaxis and, more recently, in chronic degenerative diseases (Haeggstrom and Funk, 2011; Wang et al., 2011). Experimental evidence supports that 5-lipoxygenase is the rate limiting enzyme in the conversion of arachidonic acid to cysteinyl- and noncysteinyl-leukotrienes (Denzlinger 1996; Hedi and Norbert, 2004), since inhibition of 5-LOX with nordihydroguaiaretic acid abolishes the release of 544

LTC4-like material from both gray and white matter (Simmet et al., 1988). There is also increasing evidence suggesting a role for 5-LOX and leukotrienes in acute seizures and both chemical and electrical kindling (Simmet et al., 1988; Simmet and Tippler, 1990, 1991; Rehni and Singh, 2011). Accordingly, kainic acid-induced seizures are accompanied by time-dependent cerebral cysteinyl leukotriene formation, which is inhibited by the 5-LOX inhibitor phenidone, in a dose-dependent manner (Simmet and Tippler, 1990). The currently reported anticonvulsant effect of

montelukast is in agreement with these early studies by Simmet and Tippler (1990) and the study by Rehni and colleagues (2011), who have shown that montelukast attenuates the development of kindling and pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures (Rehni and Singh, 2011). Moreover, the current findings that the i.c.v. injection of LTD4 facilitates the convulsant effect of PTZ and reverts the anticonvulsant action of montelukast constitute converging pharmacological evidence for the involvement of CysLT receptors in seizures. The finding that two other CysLT receptor antagonists (pranlukast and Bay-u9773) also decreased PTZ-induced seizures indicates that this is a common feature of CysLT antagonists, and strongly supports a role for CysLT receptors in seizures.

Several forms of brain injury trigger leukotriene production, including ischemia (Zhao et al., 2011), trauma (Farias et al., 2009), stroke (Hartiala et al., 2011) and seizures (Simmet and Tippler, 1990), which are associated with increased BBB permeability (Denzlinger, 1996; DiGennaro et al., 2004; Wang et al., 2006). Although the biological role of brain damage-associated leukotriene production remains unclear, it has been suggested that cysteinyl leukotrienes underlie injury-associated BBB disruption and, by these means, exacerbate secondary injury processes. In line with this view, montelukast and LTD4 581 respectively decreases and increases the prevalence of experimental hematogenous meningitis (Zhu et al., 2010; Maruvada et al., 2011), further supporting that CysLT receptors are potential targets for maintaining BBB integrity. In fact, our confocal microscopy data suggest that the treatment with the CysLT1R agonist increases leukocyte infiltration in the brain. On the other hand, montelukast reduced the number of CD45/IgG+ cells, indicating a protective effect of montelukast on BBB permeability.

The BBB is formed by brain microvascular endothelial cells, astrocytes and pericytes. The endothelial cells have junctions that control the coordinated opening and closing of cell-cell junctions. (Abbott et al., 2006; Kim et al, 2008). The paracellular permeability of the BBB is maintained by an equilibrium between the contractile force generated at the endothelial cytoskeleton and adhesive forces produced at endothelial cell-cell junctions and cell-matrix contacts. A dynamic interaction among these structural

elements controls the opening and closing of the paracellular pathway and thus serves as a fundamental mechanism in regulation of the blood-brain exchange (Friedman and Heinemann, 2012). The unperturbed endothelial barrier has restrictive

properties that are due primarily to the closed junctional complex. Factors that increase paracellular permeability act on the junctional complex resulting in the formation of minute intercellular gaps, which allow the passage of plasma substances (e.g. albumin), fluid and leukocytes across the barrier. Several inflammatory mediators, including leukotrienes, facilitate BBB disruption (Friedman and Heinemann, 2012; Heinemann et al., 2012). Despite intense investigation, there is still controversy about the mechanisms by which these agents affect the BBB. While some mediators appear to exclusively affect the paracellular permeability, e.g. IL-1, others predominantly increase transcellular permeability, e.g. TNF-a (Kim et al, 2012; Friedman and Heinemann, 2012). Black and Chio (1992) have shown that cysteinyl leukotriene C4 increases BBB permeability, 619

and that increased permeability after infusion of LTC4 is dependent on molecular size. Since CysLT1R and CysLT2R are constitutively expressed in the human brain vasculature and increase after injury, these authors have suggested that LTC4 binds to these receptors on endothelial cells and opens tight junctions, facilitating paracellular diffusion. The processes by which leukotrienes induce the formation of interendothelial gaps probably involve two simultaneous processes: changes in adhesive properties of tight and adherens junction proteins and reorganization of the actin cytoskeleton (Kim et al., 2008; Stamatovic et al., 2008; Abbott et al, 2006). Van Vliet and colleagues (2007) have described that electric kindling-induced status epilepticus increases BBB permeability, a finding that correlates with the development of chronic spontaneous epileptic discharges. In fact, prevention of BBB leakage by blockade of leukocyte-vascular adhesion (Fabene et al., 2008) or glia-related mechanisms (Friedman, 2011; Heinemann et al., 2012) decreases seizures. BBB is critical for regulating and maintaining the brain microenvironment and thereby enabling proper neuronal function. It acts as both a physical and metabolic barrier, modulating the passage of materials from the peripheral circulation into the central nervous system. Without such tight junctions (TJ) regulation, the brain would be subject to fluctuating levels of circulating toxins, amino acids, cytoquines and ions, they allow for restriction of ion flux and paracellular diffusion. Loss of BBB integrity and consequent infiltration of peripheral molecules lead to glial activation and alterations in the extracellular environment around neurons in the neurovascular unit (Kim et al., 2012). Several factors can cause alterations in TJ proteins that in turn cause openingof the BBB and subsequent CNS inflammation. Ischemia leads to BBB

disruptions and vasogenic edema via the opening of TJs (Stanimirovic and Satoh K., 2000), as well as hypoxia and cerebral trauma (Goldstein and Betz, 1986; Bazzoni and Dejana, 2004) and inflammation pain (Huber et al., 2001). In inflammatory CNS disorders such as multiple sclerosis, BBB alterations are often involved in disease development where increased permeability and lymphoid cell extravasation are early events (Kirk et al., 2003; Neuweit , 2004). A specific proinflammatory pathway such as IL-1 receptor/Toll-like receptor (TLR) signaling is induced in glia and neurons in human epilepsy and contributes to the onset and recurrence of experimental seizures (Ravizza et al., 2008; Maroso et al., 2010; Vezzani et al., 2011). Each of these diseases involves the disregulation of TJs that maintain the BBB. In this regard, it is worth pointing out that all animals used in the current study were implanted with cannulasfor i.c.v. injection. Therefore, there was an established inflammatory process when PTZ was injected, since

injections are performed 7 days after surgery and. Thereby, a plausible hypothesis is that implantation of the cannula produced a chronic breakdown in BBB integrity, therefore, many periphery factors (albumin, potassium, toxins, amino acids, cytoquines, etc.) were constantly entering, and CysLT antagonists treatment stopped their entry, prevented passage from this factors into the brain. It may be that BBB closure has slowed onset of PTZ-induced seizures. The protection of the brain from blood-borne toxins, proteins, and cells is critical to the brain's normal function.

Accordingly, a compromise in the BBB function accompanies many neurologic disorders, and is tightly associated with braininflammatory processes initiated by both infiltrating leukocytes from the blood, and activation of glial cells. Those inflammatory processes contribute to determining the severity and prognosis of numerous neurologic disorders, and can both cause, and result from BBB dysfunction (Cardoso et al., 2010; Kim et al., 2012); Thus, it seems plausible that damage to the microvasculature during chronic inflammation and the extravasation of serum proteins, leads to facilitation to seizures. Indeed, clinical data and animal experiments support the hypothesis that primary vascular lesions and, specifically BBB dysfunction, trigger a chain of events leading to epilepsy (Brooks et al., 2005; Persidsky et al., 2006). Significant and long-lasting dysfunction of the BBB is a hallmark of cortical injuries, regardless of etiology. BBB dysfunction is often observed in both human and animal models of traumatic and ischemic brain injuries, within and surrounding brain tumors, infectious and inflammatory brain diseases and

neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and vascular dementia (Abbott et al., 2006; Friedman et al., 2012).

In epilepsy, magnetic resonance imaging studies in patients with posttraumatic epilepsy demonstrated permeability of BBB to contrast agents, co-localized with the presumed epileptic focus (Tomkins et al., 2011). In animal studies, a role for BBB opening was suggested in the progression of temporal epilepsy lobe (TLE) based on the finding of serum albumin presence in brain parenchyma following SE, and a positive correlation between the extent of BBB opening and the number of seizures (van Vliet et al., 2007).

The results from the confocal microscopy experiments have shown that PTZ increases leukocyte infiltration in the hemisphere that has been implanted with the cannula, but not in the contralateral hemisphere, suggesting that cannula implantation has an important effect on the tissue response to the convulsant agent. In addition, it also showed that PTZ-induced seizures promote leukocyte infiltration in an already damaged tissue. These findings, to some extent, agree with the data from Fabene and colleagues (Fabene et al., 2008), who have shown a role for leukocyte infiltration in the seizures induced by pilocarpine, in the sense that leukocyte infiltration may play a central role in the induction of hyperexcitability states. While the current study shows that montelukast decreases seizure susceptibility, defining whether the anticonvulsant effect of the blockade of CysLT1 receptors is due to a stabilizing effect on the BBB, or not, requires a thoughtful discussion of the whole data obtained, including those obtained with the CysLTR agonist, LTD4.

The following experimental findings indicate that the maintenance of BBB integrity may underlie the currently reported anticonvulsant effect of CysLT1R antagonists: 1. intracerebroventricular injection of montelukast prevented seizures and maintained the BBB integrity at the same range of doses; 2. increased latency to seizures correlated with low BBB permeability scores (Fig. 8). Notwithstanding, one might argue that if the anticonvulsant effect of montelukast depended on BBB integrity, these effects should not be dissociable by any means. Low doses of LTD4 (0.2 and 2 pmol), prevented the anticonvulsant, but not the protective effect of montelukast on BBB. Such a dissociation, according to this view, suggests that BBB maintenance does not determine the anticonvulsant effect of montelukast. Considering the exposed above, it seems unlike that there is a direct cause–effect relationship between the anticonvulsant activity of montelukast and its ability to

protect the BBB, at least in what concerns the BBB permeability to fluorescein and fluorescein-bound molecules. Moreover, it suggests that montelukast decreases seizures by mechanisms other than decreasing BBB permeability to fluorescein and fluorescein-bound molecules, which remain to be identified. It is worth mentioning, however, that our pharmacological data do not allow ruling out that mechanisms unrelated and related to BBB protection may co-exist, and contribute for the montelukast-induced decreased seizure susceptibility, particularly in chronic models, such as pilocarpine-induced epilepsy, in which inflammation is clearly engaged (Fabene et al, 2008; Rehni and Singh, 2011). In summary, this study shows that intracerebroventricular injection of montelukast decreases PTZ-induced seizures and BBB disruption, suggesting that CysLT1 receptors may be a suitable target for anticonvulsant development. This view is corroborated by recent clinical evidence that add-on therapy with pranlukast reduces seizure frequency in patients with intractable partial epilepsy (Takahashi et al, 2013).

Acknowledgments—Dr. João Batista Teixeira da Rocha for providing laboratory facilities, Capes, CNPq, PIBIC/CNPq, Fapergs, CAFP-CAPES.

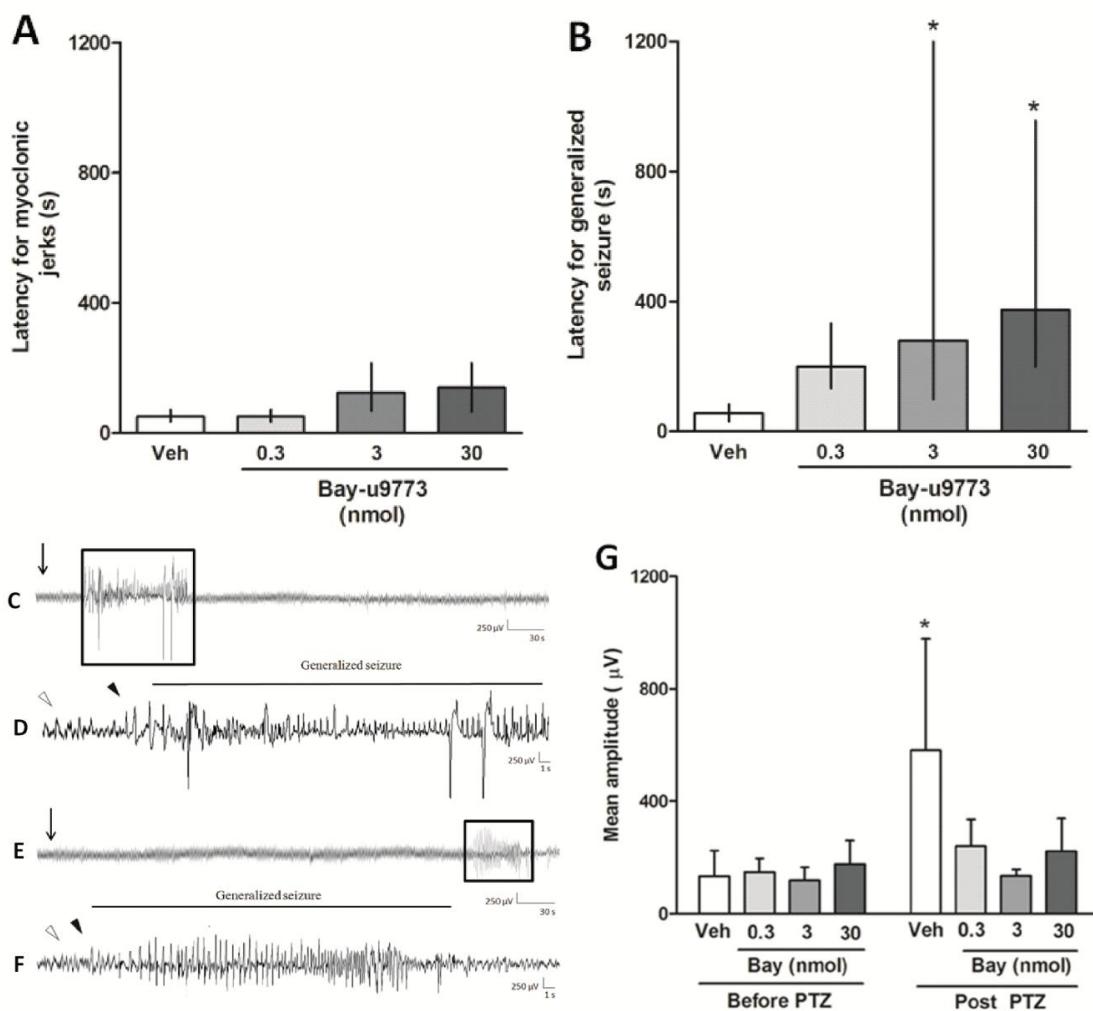


Fig. 1. Effect of Bay-u9973 (Bay) (0.3, 3 and 30 nmol, i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 lmol/2 IL, i.c.v.). (A) Latency to myoclonic jerks; (B) Latency to tonic-clonic generalized seizures. Data expressed as median and interquartile range; /p<0.05 vs vehicle. Representative EEG recordings after administration of PTZ (1.8 lmol/2 IL, i.c.v.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in saline, i.c.v.) or (E) Bay-u9973 (30 nmol, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the box in C and E are shown in D and F. The arrow indicates PTZ injection and the black arrowhead indicates the onset of generalized tonic-clonic seizures; G) Mean amplitude of EEG recordings before (basal) and after PTZ. Data expressed as mean and standard deviation; *p<0.05 vs control (before PTZ); (n=4–6 per group).

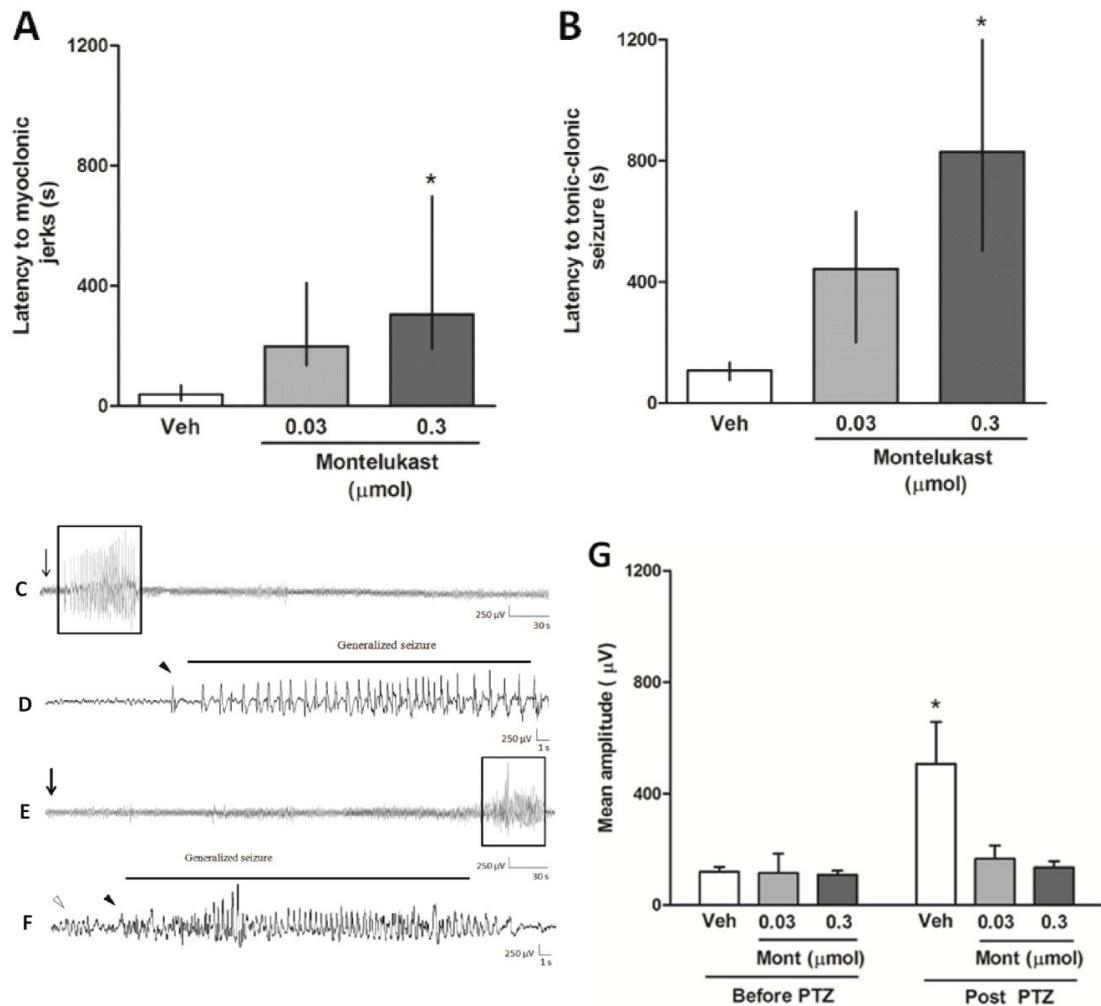


Fig. 2. Effect of montelukast (Mont) (0.03 and 0.3 μmol , i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 $\mu\text{mol}/2 \text{ mL}$, i.c.v.). (A) Latency to myoclonic jerks; (B) Latency to tonic-clonic generalized seizures. Data expressed as median and interquartile range; / $p<0.05$ vs vehicle. Representative EEG recordings after administration of PTZ (1.8 $\mu\text{mol}/2 \text{ mL}$, i.c.v.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in saline, i.c.v.) or (E) montelukast (0.3 μmol , i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the box in C and E are shown in D and F. The arrow indicates PTZ injection and the black arrowhead indicates the onset of generalized tonic-clonic seizures. Data are expressed as median and interquartile range for $n=5-6$ in each group. / $p<0.05$ vs vehicle. (G) Mean amplitude of EEG recordings. Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0.05$ vs control (before PTZ); ($n=5-7$ per group).

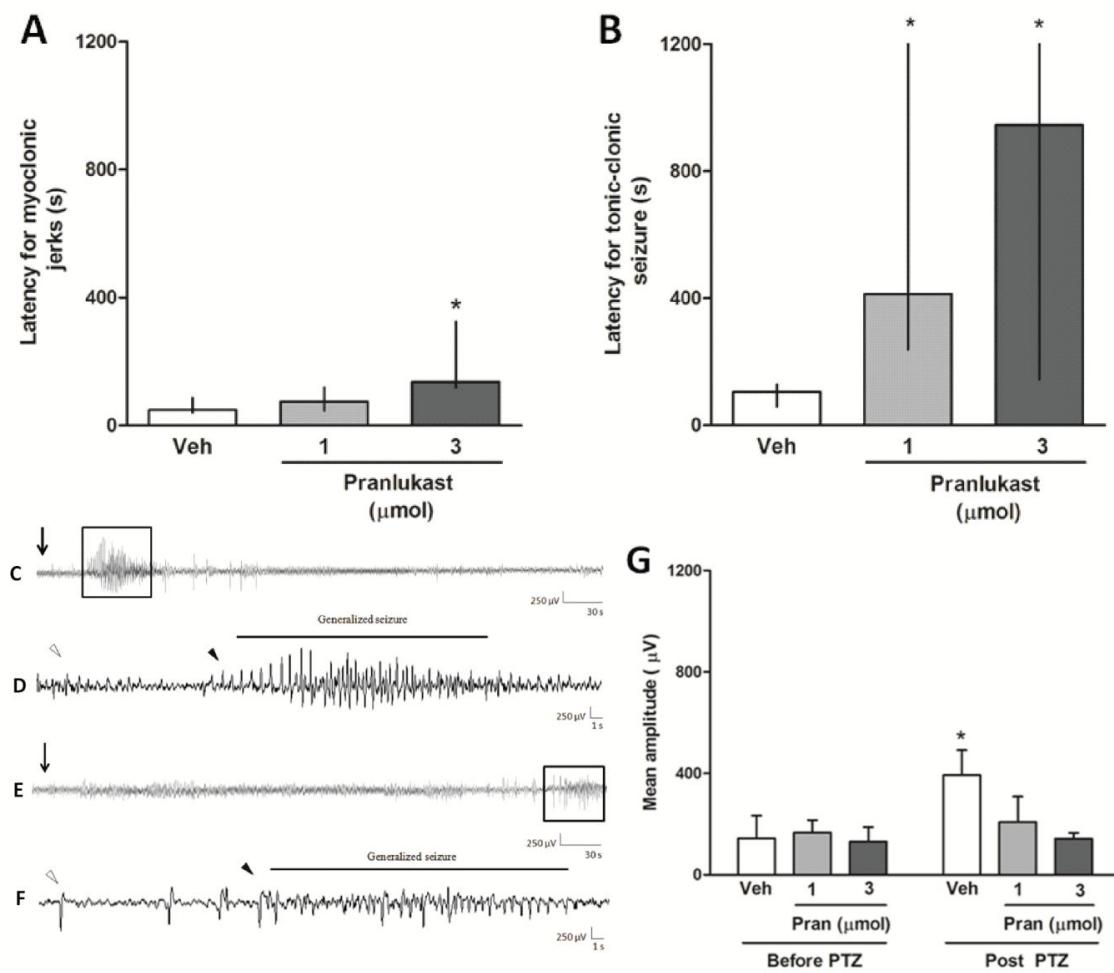


Figure 3 - Effect of pranlukast (1 and 3 μmol , i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{L}$, i.c.v.). A) Latency to myoclonic jerks; B) Latency to generalized tonic-clonic seizures. Data expressed as median and interquartile range; * $p<0.05$ vs vehicle. Representative EEG recordings after administration of PTZ (1.8 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{L}$, i.c.v.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in saline, i.c.v.) or (E) pranlukast (3 μmol , i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the box in C and E are shown in D and F. The arrow indicates PTZ injection and the black arrowhead indicates the onset of generalized tonic-clonic seizures. Data expressed as median and interquartile range for $n=4-7$ in each group. * $p<0.05$ vs vehicle; G) Mean amplitude of EEG recordings in PTZ-induced seizures. Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0.05$ vs control (before PTZ); ($n=4-6$ per group).

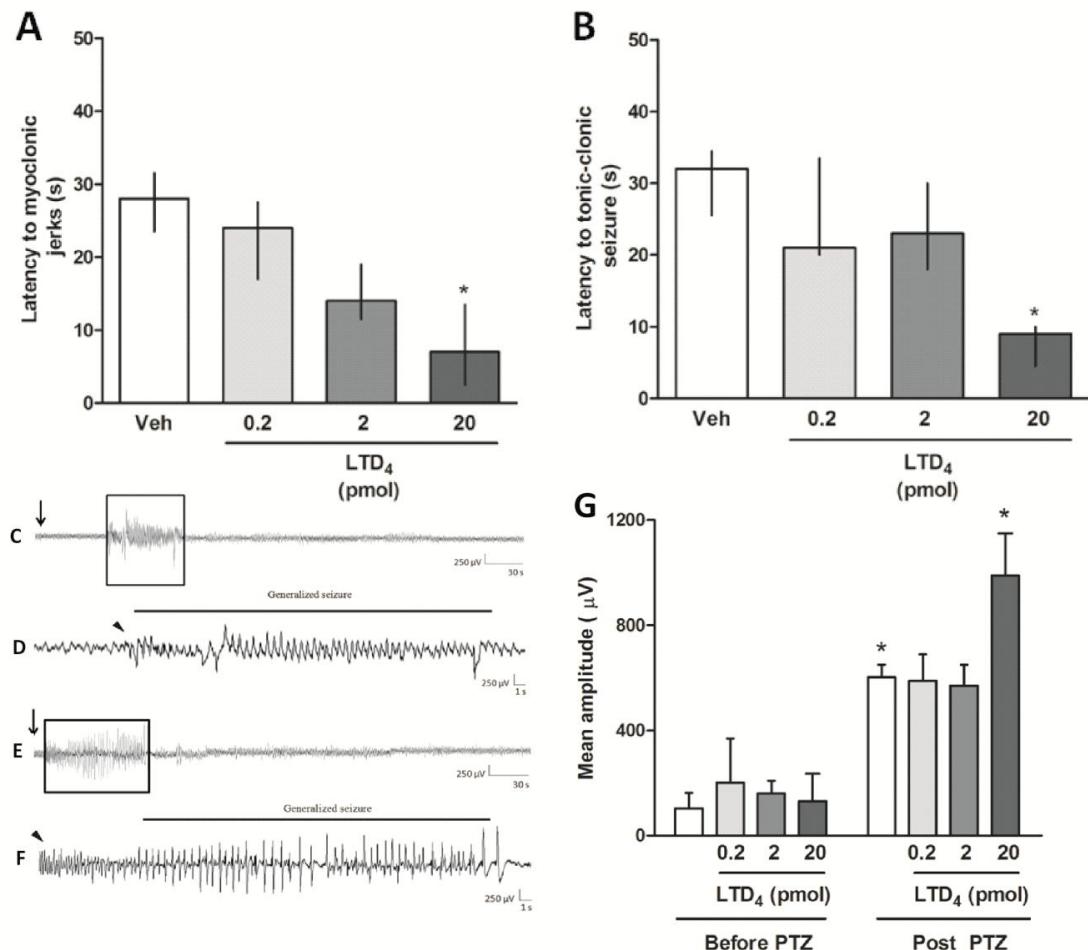


Figure 4 - Effect of LTD4 (0.2, 2 and 20 pmol/ μ L i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.). A) Latency to myoclonic jerks; B) Latency to generalized tonic-clonic seizures. Data expressed as median and interquartile range; *p<0.05 vs vehicle. Representative EEG recordings after administration of PTZ (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.) in an animal treated with (C) vehicle (0.5% ethanol in saline, i.c.v.) or (E) LTD4 (20 pmol, i.c.v.). The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C and E are shown in D and F. The arrow indicates PTZ administration; the black arrowhead indicates the onset of generalized tonic-clonic seizures; G) Mean amplitude of EEG recordings on PTZ-induced seizure. Data expressed as mean and standard deviation; *p<0.05 vs control (before PTZ); (n=5-7 per group).

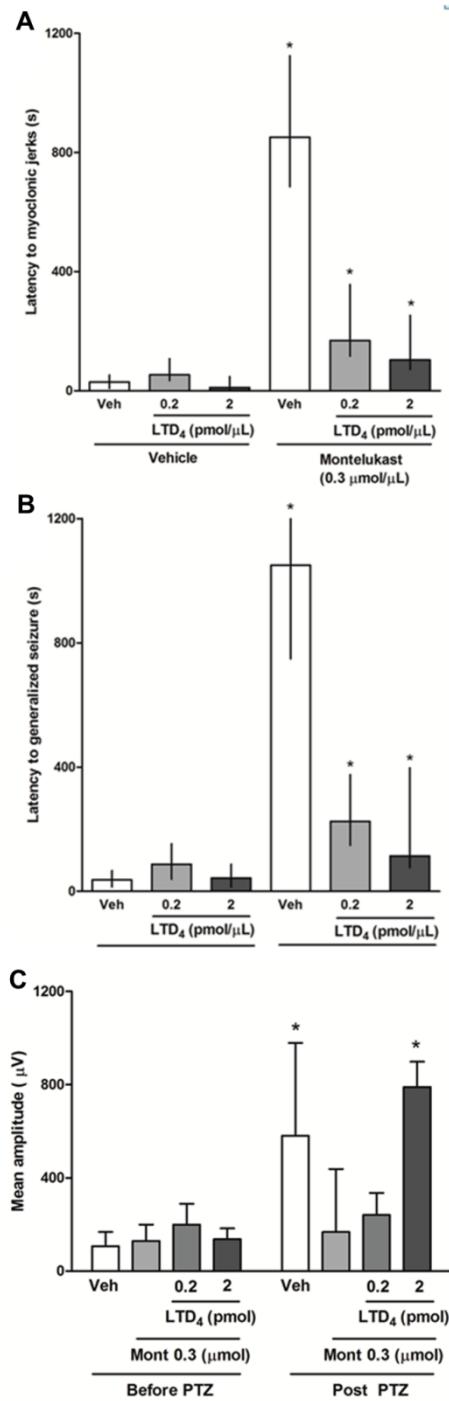


Figure 5 – LTD4 (0.2 and 2 pmol, i.c.v.) reverts the protective effect of montelukast (0.3 μ mol, i.c.v.) on PTZ-induced seizures (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.). A) Latency to myoclonic jerks; B) Latency to generalized tonic-clonic seizures. Data are presented as median and interquartile range; * $p<0.05$ vs vehicle. C) Mean amplitude of EEG recordings. Data are presented as mean and standard deviation; * $p<0.05$ vs respective control (before PTZ); (n=5-6 per group).

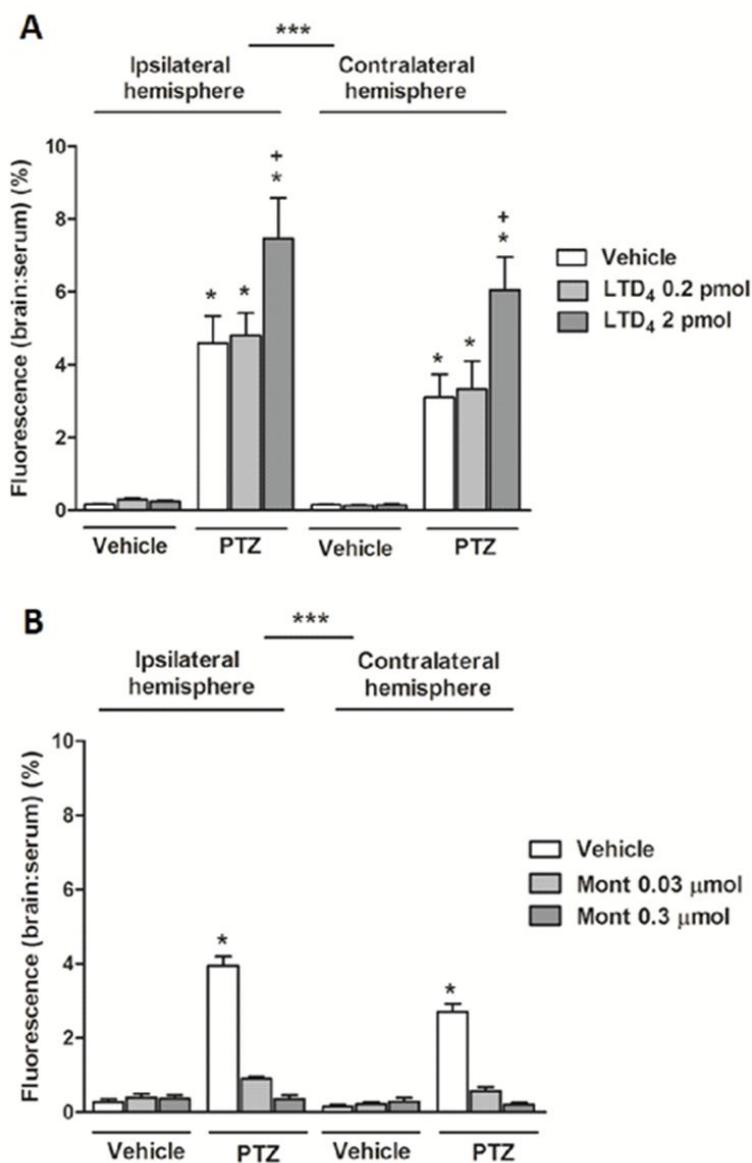


Figure 6 - Effect of LTD4 (0.2 and 2 pmol, i.c.v., A) and montelukast (0.03 and 0.3 μ mol, i.c.v., B) on PTZ-induced disruption of BBB (1.8 μ mol/2 μ L, i.c.v.). Data are presented as mean and S.E.M. *p < 0.05 vs respective vehicle; +p < 0.05 vs vehicle-PTZ; ***p < 0.05 ipsilateral vs contralateral hemispheres; (n = 6-7 per group).

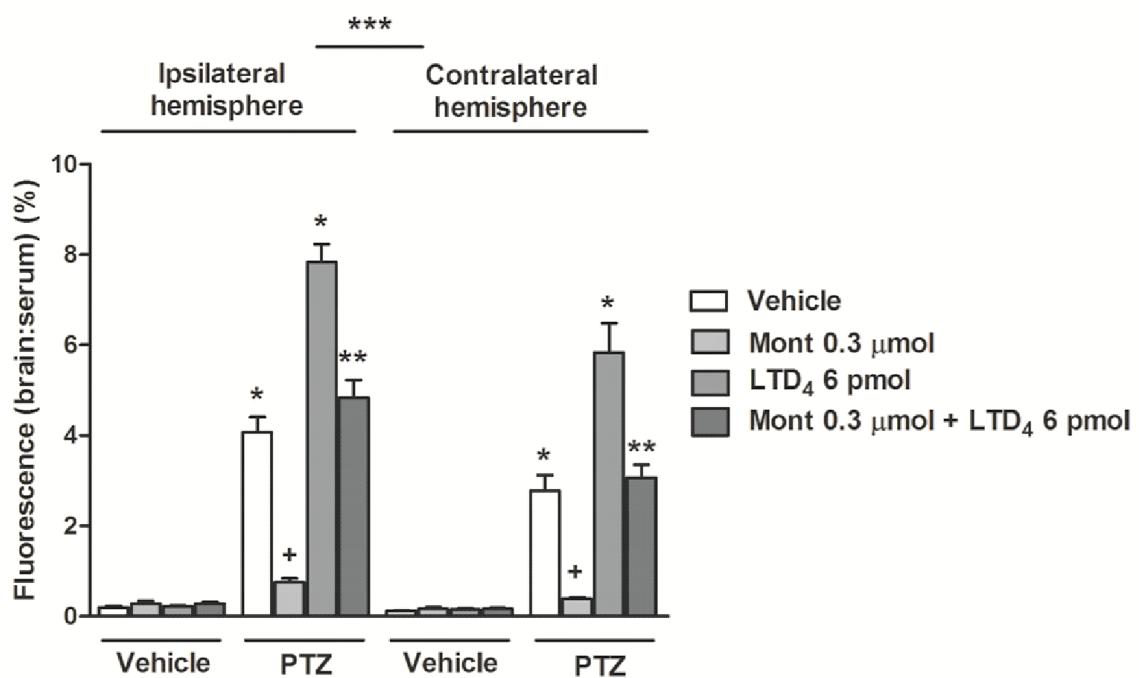


Figure 7 – LTD4 (6 pmol, i.c.v.) reverses the protective effect of montelukast (0.3 μmol, i.c.v.) on BBB after PTZ-induced seizures (1.8 μmol/2 μL, i.c.v.). Data are presented as mean and S.E.M. *p<0.05 vs respective control (vehicle-vehicle); #p<0.05 vs LTD4-PTZ group; **p<0.05 vs montelukast-PTZ group. ***p<0.05 ipsilateral vs contralateral hemispheres; (n=4-5 per group).

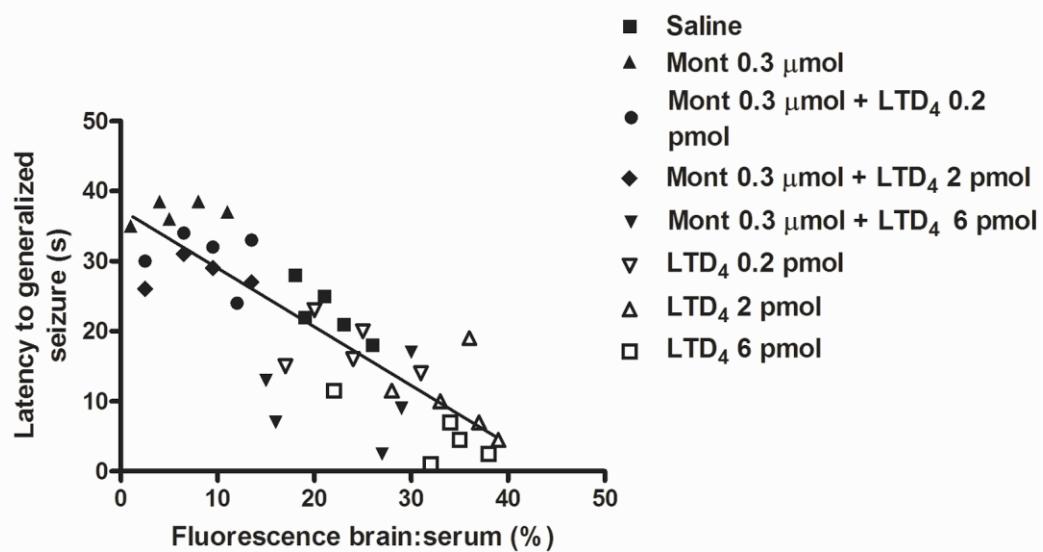


Figure 8 - Correlation plot of ranked data of brain:serum fluorescence ratio of the ipsilateral hemisphere against respective latency to generalized seizure of the experiments shown in Figures 6 (dose-effect curve for LTD4 and montelukast) and 7 (effect of LTD4 on montelukast-induced protection against seizures). Spearman $r=-0.841$ $p<0.0001$.

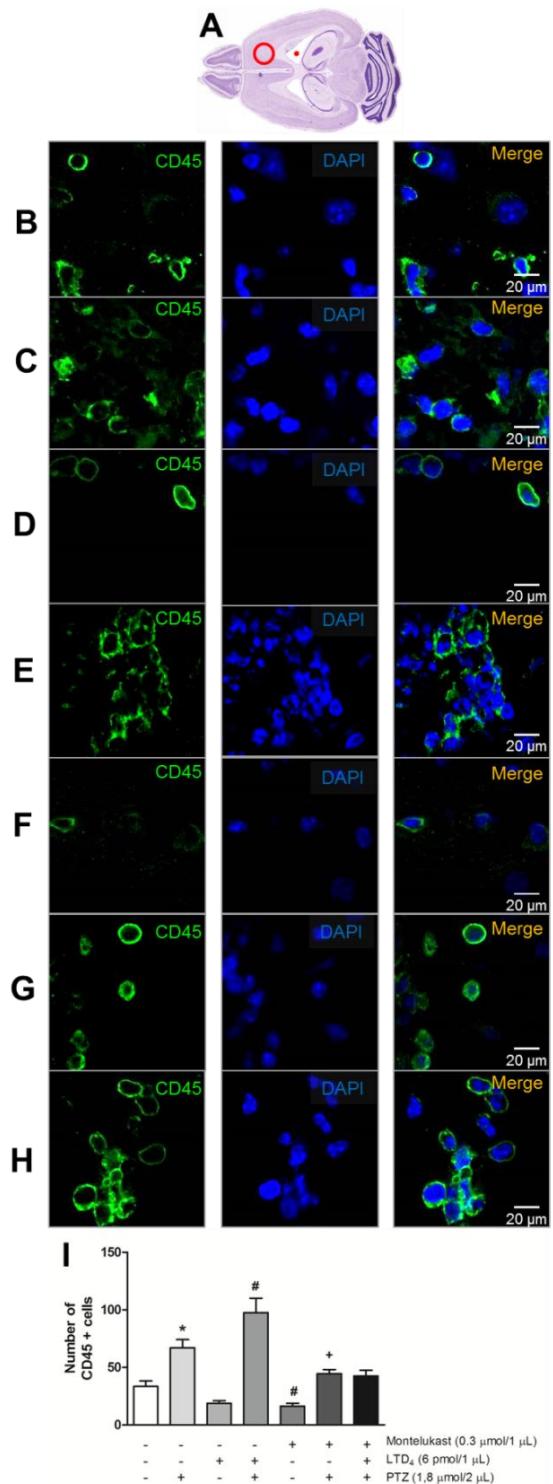


Figure 9 - Effect of PTZ, LTD4 (6 pmol) and montelukast (0.3 μmol) on the number CD45+ cells in the cerebral cortex. Representative images of brain slices (10 μm) stained with anti-CD45 and DAPI of mice injected with vehicle (line A); vehicle/PTZ (line B); LTD4/vehicle (line C); LTD4/PTZ (line D); vehicle/montelukast (E); montelukast/PTZ (F) and montelukast/LTD4/PTZ (G). Scale bars: 20 μm (H). Data are presented as mean and SEM. *p<0.001 vs vehicle; #p<0.001 vs vehicle/PTZ; +p<0.001 vs LTD4/PTZ (n=4-5 per group).

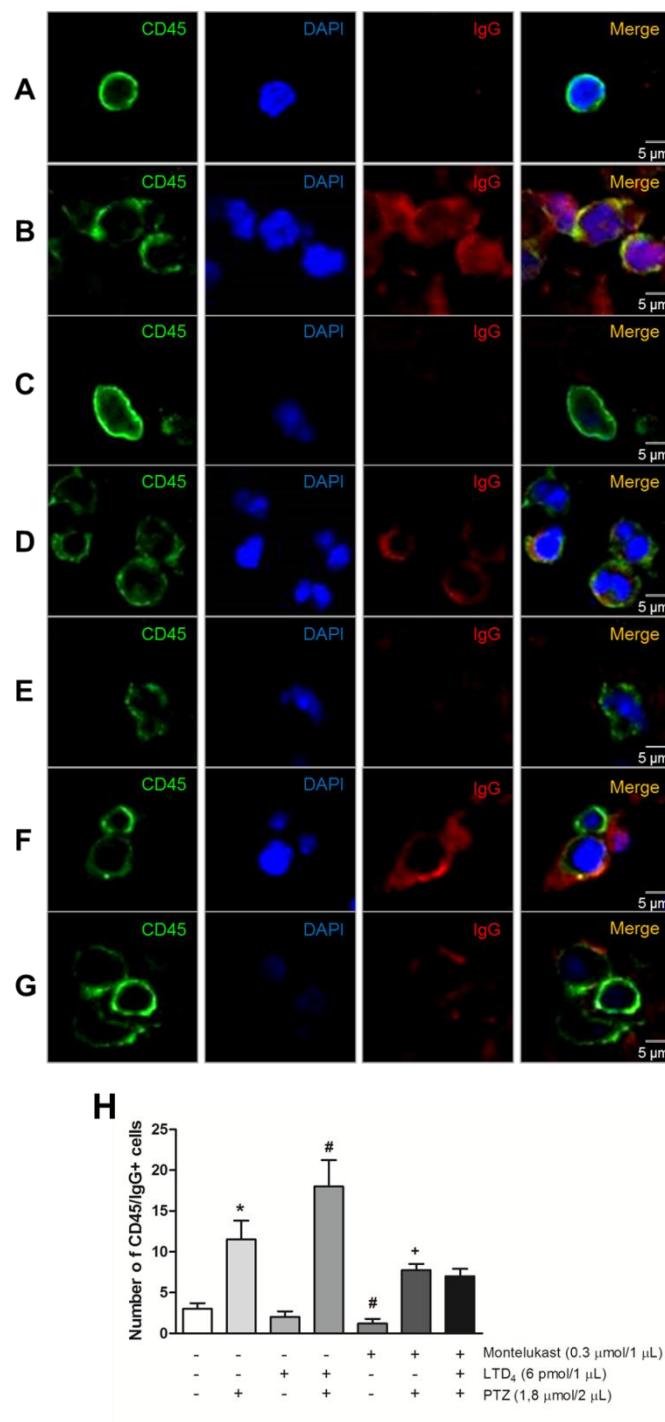


Figure 10 - Effect of PTZ, LTD4 (6 pmol) and montelukast (0.3 μ mol) on the number of double labeled CD45/IgG+ cells in the cerebral cortex. Representative images of brain slices (10 μ m) stained with anti-CD45, anti-IgG and DAPI of mice that received vehicle (line A); vehicle/PTZ (line B); LTD4/vehicle (line C); LTD4/PTZ (line D); vehicle/montelukast (E); montelukast/PTZ (F) and montelukast/LTD4/PTZ (G) are shown. Scale bars: 5 μ m (H). Data are presented as mean and S.E.M. *p<0.001 vs vehicle; #p<0.001 vs vehicle/PTZ; +p<0.001 vs LTD4/PTZ (n=4-5 per group).

References

- Abbott N.J., Rönnbäck L. and Hansson E., Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier, *Nat Neurosci* 7, 2006, 41–53.
- Akarsu E.S., Ozdayi S., Algan E. and Ulupinar F., The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction, *Epilepsy Res* 71, 2006, 181–187.
- Badawy R.A.B., Freestone D.R., Lai A. and Cook M.J., Epilepsy: ever-changing states of cortical excitability, *Neuroscience* 222, 2012, 89–99.
- Balosso S., Maroso M., Sanchez-Alavez M., Ravizza T., Frasca A., Bartfai T. and Vezzani A., A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta, *Brain* 131, 2008, 3256–3265.
- Biber N., Toklu H.Z., Solakoglu S., Gultomruk M., Hakan T., Berkman Z. and Dulger F.G., Cysteinyl-leukotriene receptor antagonist montelukast decreases blood–brain barrier permeability but does not prevent oedema formation in traumatic brain injury, *Brain Inj* 23, 2009, 577–584.
- Black K.L. and Chio C.C., Increased opening of blood–tumour barrier by leukotriene C4 is dependent on size of molecules, *Neurol Res* 14, 1992, 402–404.
- Brock T.G., Regulating leukotriene synthesis: the role of nuclear 5-lipoxygenase, *J Cell Biochem* 96, 2005, 1203–1211.
- Campbell I.L., Abraham C.R., Masliah E., Kemper P., Inglis J.D., Oldstone M.B. and Mucke L., Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1993, 10061–10065.
- Chou V.P., Holman T.R. and Manning-Bog A.B., Differential contribution of lipoxygenase isozymes to nigrostriatal vulnerability, *Neuroscience* 228, 2013, 73–82.
- Denzlinger C., Biology and pathophysiology of leukotrienes, *Crit Rev Oncol Hematol* 23, 1996, 167–223.
- Di Gennaro A., Carnini C., Buccellati C., Ballerio R., Zarini S., Fumagalli F., Viappiani S., Librizzi L., Hernandez A., Murphy R.C., Constantin G., De Curtis M., Folco G. and Sala A., Cysteinyl-leukotrienes receptor activation in brain inflammatory reactions and cerebral edema formation: a role for transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes, *FASEB J* 18, 2004, 842–844.
- Dupré D.J., Le Gouill C., Gingras D., Rola-Pleszczynski M. and Stankova J., Inverse agonist activity of selected ligands of the cysteinyl-leukotriene receptor 1, *J Pharmacol Exp Ther* 309, 2004, 102–108.

Fabene P.F., Navarro Mora G., Martinello M., Rossi B., Merigo F., Ottoboni L., Bach S., Angiari S., Benati D., Chakir A., Zanetti L., Schio F., Osculati A., Marzola P., Nicolato E., Homeister J.W., Xia L., Lowe J.B., McEver R.P., Osculati F.,

Sbarbati A., Butcher E.C. and Constantin G., A role for leukocyte–endothelial adhesion mechanisms in epilepsy, *Nat Med* 14, 2008, 1377–1383.

Farias S., Frey L.C., Murphy R.C. and Heidenreich K.A., Injury-related production of cysteinyl leukotrienes contributes to brain damage following experimental traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 26, 2009, 1977–1986.

Friedman A., Blood–brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg?, *Epilepsia* 52 (Suppl. 8), 2011, 19–20.

Friedman A. and Heinemann U., Role of blood–brain barrier dysfunction in epileptogenesis, In: Noebels J.L., Avoli M., Rogawski M.A., Olsen R.W. and Delgado-Escueta A.V., (Eds.), *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies* [Internet], 4th ed., 2012, National Center for Biotechnology Information (US); Bethesda (MD).

Friedman A., Kaufer D. and Heinemann U., Blood–brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy, *Epilepsy Res* 85, 2009, 142–149.

Goldstein G.W., Betz A.L. The blood-brain barrier. *Sci Am* 255, 1986, 74–83. Haeggstrom J.Z. and Funk C.D., Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease, *Chem Rev* 111, 2011, 5866–5898

Hartiala J., Li D., Conti D.V., Vikman S., Patel Y., Tang W.H., Brennan M.L., Newman J.W., Stephensen C.B., Armstrong P., Hazen S.L. and Allayee H., Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease, *Hum Genet* 129, 2011, 617–627.

Hedi H. and Norbert G., 5-Lipoxygenase pathway, dendritic cells, and adaptive immunity, *J Biomed Biotechnol* 2004, 2004, 99–105.

Heinemann U., Kaufer D. and Friedman A., Blood–brain barrier dysfunction, TGF beta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy, *Glia* 60, 2012, 1251–1257.

Jimenez-Mateos E.M. and Henshall D.C., Epilepsy and microRNA, *Neuroscience* 15 (238), 2013, 218–229.

Kim K.S. Methods for treating or preventing brain infections. Patent No. WO 2009/152454A1. World Intellectual Property Organization 2009;1-17. Kim H.C., Jhoo W.K., Bing G., Shin E.J., Wie M.B., Kim W.K. and Ko K.H., Phenidone prevents

kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms, *Brain Res* 874, 2000, 15–23.

Kim Y.R., Tejima E., Huang S., Atochin D.N., Dai G., Lo E.H., Huang P.L., Bogdanov A., Jr and Rosen B.R., In vivo quantification of transvascular water exchange during the acute phase of permanent stroke, *Magn Reson Med* 60, 2008, 813–821.

Kim S.Y., Buckwalter M., Soreq H., Vezzani A. and Kaufer D., Blood–brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis, *Epilepsia* 53, 2012, 37–44.

Lewis R.A., Austen K.F. and Soberman R.J., Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases, *N Engl J Med* 323, 1990, 645–655.

Manev H., Uz T. and Qu T., Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase following systemic administration of kainate to rats, *Restor Neurol Neurosci* 12, 1998, 81–85.

Maroso M., Balosso S., Ravizza T., Liu J., Bianchi M.E. and Vezzani A., Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1, *J Intern Med* 270, 2011, 319–326.

Maruvada R., Zhu L., Pearce D., Sapirstein A. and Kim K.S., Host cytosolic phospholipase A(2)alpha contributes to group B Streptococcus penetration of the blood–brain barrier, *Infect Immun* 79, 2011, 4088–4093.

McColl, C.D., Horne M.K., Finkelstein D.I., Wong J.Y., Berkovic S.F., Drago J. Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44, 2003, 234–243.

Morrey J.D., Olsen A.L., Siddharthan V., Motter N.E., Wang H., Taro B.S., Chen D., Ruffner D. and Hall J.O., Increased blood–brain barrier permeability is not a primary determinant for lethality of West Nile virus infection in rodents, *J Gen Virol* 89, 2008, 467–473.

Nur B.G., Kahramaner Z., Duman O., Dundar N.O., Sallakci N., Yavuzer U., Haspolat S. Interleukin-6 gene polymorphism in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 46, 2012, 36–38. Oby E. and Janigro D., The blood–brain barrier and epilepsy, *Epilepsia* 47, 2006, 1761–1774.

Oliveira M.S., Furian A.F., Rambo L.M., Ribeiro L.R., Royes L.F., Ferreira J., Calixto J.B. and Mello C.F., Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors, *Neuroscience* 152, 2008, 1110–1118.

Paxinos G. and Franklin K.B.J., *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed., 2001, Academic Press; San Diego, USA.

Qi L.L., Fang S.H., Shi W.Z., Huang X.Q., Zhang X.Y., Lu Y.B., Zhang W.P., Wei E.Q. CysLT2 receptor-mediated AQP4 up-regulation is involved in ischemic-like injury through activation of ERK and p38 MAPK in rat astrocytes. *Life Sci* 88, 2011, 50-56.

Rehni A.K. and Singh T.G., Modulation of leukotriene D4 attenuates the development of seizures in mice, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85, 2011, 97–106.

Salvadori M.G., Bandero C.R., Jesse A.C., Gomes A.T., Rambo L.M., Bueno L.M., Bortoluzzi V.T., Oliveira M.S. and Mello C.F., Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures, *Epilepsia* 53, 2012, 189–198.

Samuelsson B., Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles, *Harvey Lect* 75, 1979, 1–40.

Simmet T., Luck W., Delank W.K. and Peskar B.A., Formation of cysteinyl-leukotrienes by human brain tissue, *Brain Res* 456, 1988, 344–349.

Simmet T. and Tippler B., Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid, *Brain Res* 515, 1990, 79–86.

Simmet T. and Tippler B., On the relation between cerebral cysteinyl-leukotriene formation and epileptic seizures, *Brain Res* 540, 1991, 283–286.

Stamatovic S.M., Keep R.F. and Andjelkovic A.V., Brain endothelial cell–cell junctions: how to “open” the blood brain barrier, *Curr Neuropharmacol* 6, 2008, 179–192.

Stanimirovic D., Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 10, 2000:113-126. Takahashi Y., Imai K., Ikeda H., Kubota Y., Yamazaki E. and Susa F., Open study of pranlukast add-on therapy in intractable partial epilepsy, *Brain Dev* 35, 2013, 236–244.

Tomkins O., Feintuch A., Benifla M., Cohen A., Friedman A., Shelef I. Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011; 2011: 765923.

van Vliet E.A., da Costa Araujo S., Redeker S., van Schaik R., Aronica E. and Gorter J.A., Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy, *Brain* 130, 2007, 521–534.

Vane J.R., Bakhle Y.S. and Botting R.M., Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 1998, 97–120.

Vezzani A., Inflammation and epilepsy, *Epilepsy Curr* 5, 2005, 1–6.

Vezzani A. and Friedman A., Brain inflammation as a biomarker in epilepsy, *Biomark Med* 5, 2011, 607–614.

Vezzani A., Moneta D., Conti M., Richichi C., Ravizza T., De Luigi A., De Simoni M.G., Sperk G., Andell-Jonsson S., Lundkvist J., Iverfeldt K. and Bartfai T., Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2000, 11534–11539.

Walker L. and Sills G.J., Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy?, *Epilepsy Curr* 12, 2012, 8–12.

Wang L., Du C., Lv J., Wei W., Cui Y. and Xie X., Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 187, 2011, 2336–2345.

Wang M.L., Huang X.J., Fang S.H., Yuan Y.M., Zhang W.P., Lu Y.B., Ding Q. and Wei E.Q., Leukotriene D4 induces brain edema and enhances CysLT2 receptor-mediated aquaporin 4 expression, *Biochem Biophys Res Commun* 350, 2006, 399–404.

Zhao R., Shi W.Z., Zhang Y.M., Fang S.H. and Wei E.Q., Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, attenuates chronic brain injury after focal cerebral ischaemia in mice and rats, *J Pharm Pharmacol* 63, 2011, 550–557.

Zhu L., Maruvada R., Sapirstein A., Malik K.U., Peters-Golden M. and Kim K.S., Arachidonic acid metabolism regulates *Escherichia coli* penetration of the blood–brain barrier, *Infect Immun* 78, 2010, 4302–4310.

4.2 Manuscrito II

Original paper

CysLT1 receptor activation modulates hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice

Quéli Fernandes Lenz^{1,2}, Fernanda Rossatto Temp^{1,2},
Laura Hautrive Milanesi¹, Joseane Righes Marafiga¹, Ana Cláudia Jesse^{1,2}
Carlos Fernando Mello^{1,2}.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia¹, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia², Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

Dr. Carlos Fernando Mello

Dep. Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL.
FAX: +55 55 3220 9378
e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br
mello.cf@gmail.com (alternative)

Abstract

Leukotrienes are potent bioactive lipids derived from arachidonic acid (AA) metabolism, synthesized through the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway in mammalian brain. Growing evidences has show that are important contributors in pathophysiology of several inflammatory disorders of central nervous system, including traumatic brain injury, encephalitis, Parkinson disease, ischaemia, neuropathic pain and epilepsy. support the notion that cysteinyl leukotrienes may play a role in the pathophysiology of different neurodegenerative diseases in which excitotoxicity has been implicated. However, little is known about the molecular mechanisms by which CysLT facilitates excitatory activity. Na⁺K⁺-ATPase is a plasma membrane protein which plays a key role in the maintenance of electrolyte homeostasis in all tissues and in neurons, Na⁺,K⁺-ATPase contributes for the maintenance of excitability. It means that a decrease on Na⁺,K⁺-ATPase activity may account for the increased excitability in central nervous system. In the present study we showed that incubation with LTD4 10 and 100 nM decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity alpha $\frac{2}{3}$ and alpha 1 subunits, respectively, in mice hippocampal slices, evidencing a decreased isoform-specific. The inhibitory effect of LTD4 on Na⁺,K⁺-ATPase activity was not observed in hippocampal homogenates, indicating that it requires intact cells. Moreover, we showed that LTD4-induced decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity was reversed by CysLT1R inverse agonist, montelukast (1 μ M). In addition, we also showed that possibly the PKC activation pathway is involved in LTD4-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices, since PKC inhibitor, GF 109203X (0,3 μ M), prevent this effect. Importantly, we also showed that LTD4 effect on Na⁺,K⁺-ATPase activity *in vitro* also occurred *ex vivo*, confirming the biological importance of the current results. In summary, we showed that CysLT1 receptor activation modulates hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice, suggesting a possible mechanism for the involvement of leukotrienes in several disorders related with brain inflammation and hyperexcitability.

Key words: CysLT1 receptor; Leukotrienes; Na⁺,K⁺-ATPase

Introduction

Leukotrienes are potent bioactive lipids derived from arachidonic acid (AA) metabolism, synthesized through the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway in mammalian brain (Denzlinger, 1996). They are important contributors in pathophysiology of several inflammatory disorders of central nervous system, including traumatic brain injury (Farias et al, 2009), encephalitis (Zhu et al, 2010), Parkinson disease (Chou et al., 2013), ischaemia (Zhang et al, 2013), neuropathic pain (Zhou et al, 2014) and epilepsy (Rehni and Singh, 2011). In fact, the 5, 12 and 15-LOX pathways have been implicated in the pathogenesis of several neurological disorders (Simmet and Tippler, 1990, Hedi and Norbert, 2004; Rheni and Singh, 2011).

In this sense, it has been shown that kainate-induced seizures are accompanied by time-dependent increase on leukotriene synthesis (Simmet and Tippler, 1990). In addition, both seizures and leukotriene production are reduced by the 5-LOX inhibitors phenidone and BW755C, that inhibit both LOX and COX pathways, suggesting that leukotriene pathway plays an important role in seizures (Simmet and Tippler, 1990, Kim et al., 2000). In line with this view, it has been recently shown that the CysLT1 receptor antagonist pranlukast and the inverse agonist montelukast decrease PTZ-induced seizures in mice. Moreover, LTD4, a CysLT1 receptor agonist, facilitates PTZ-induced seizures and reverses the protective effect of montelukast (Lenz et al., 2014). Zhang and colleagues (2013) investigated the involvement of CysLT2 receptor in oxygen-glucose deprivation/recovery (OGD/R)-induced ischemic neuronal injury, and showed that HAMI 3379, novel CysLT2 antagonist, effectively blocks CysLT2R-mediated microglial activation in primary microglial culture, thereby indirectly attenuating ischemic neuronal injury.

Moreover, Firuzi and colleagues (2008) studied the effect of 5-lipoxygenase-targeted gene disruption on the amyloid phenotype of a transgenic mouse model of AD, the Tg2576. Amyloid- β (A β) deposition in the brains of Tg2576 mice lacking 5-LO was reduced by 64–80% compared with Tg2576 controls. This reduction was associated with a similar significant decrease in A β levels.

These findings support the notion that cysteinyl leukotrienes may play a role in the pathophysiology of different neurodegenerative diseases in which excitotoxicity has been implicated. However, little is known about the molecular mechanisms by

which CysLT facilitates excitatory activity.

Na^+/K^+ -ATPase is a plasma membrane protein which plays a key role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis in all tissues (Horisberger, 2004). In neurons, Na^+/K^+ -ATPase widely contributes for the maintenance of excitability and regulates synaptic transmission by providing the Na^+ electrochemical gradient that drives the neurotransmitter uptake from the synaptic cleft and the extrusion of intraneuronal Ca^{2+} (Lingrel et al., 2003; Horisberger, 2004, Aperia, 2012). It means that a decrease on Na^+/K^+ -ATPase activity may account for the increased excitability in central nervous system. Furthermore, Oliveira et al. (2009) have demonstrated that PGE2 decreases Na^+/K^+ -ATPase activity in rat hippocampal slices by increasing ser-943 phosphorylation, a site on enzyme that is regulated by PKA. In line this view, Foley (1997) examined the effect of arachidonic acid metabolites of 5-, 12-, and 15-lipoxygenase on Na^+/K^+ -ATPase activity in synaptosomal plasma membranes from rat cerebral cortex.

It has been observed that 5-HPETE, the predominant arachidonic acid hydroperoxide product of 5-lipoxygenase, precursor of LTD4, inhibits synaptosomal Na^+/K^+ -ATPase activity, proposing the possibility that 5-HPETE may function as a regulator of neuronal Na^+/K^+ -ATPase activity *in vivo*.

Several studies have implicated the involvement of Na^+/K^+ -ATPase with lipoxygenase pathway, among them, Singh and colleagues (2012) showed that NDGA, a lipoxygenase inhibitor, partially restored the relaxation to $\text{K}(+)$ in sheep pulmonary arterial rings, impaired in the presence of arachidonic acid. This finding evidence a restoration Na^+/K^+ -ATPase activity, since this relaxation is induced by Na^+/K^+ -ATPase.

Furthermore, Ozkan and colleagues (2010) revealed that pre-treatment with montelukast, CysLT1R inverse agonist protected against cerulein-induced decrease on Na,K ,ATPase activity an pancreatitis acute model in rats. However, little is known about the effect of cisteynyl leukotrienes and CysLT1 receptors on Na^+/K^+ -ATPase activity in brain as well as its mechanisms of interaction. Here we hypothesized that LTD4 can inhibit Na^+/K^+ -ATPase activity in mouse hippocampal slices by binding on Gq-protein coupled CysLT1 receptors followed by PKC activation and subsequently Na^+/K^+ -ATPase phosphorylation. Therefore, in this study we aimed to investigate the role of CysLT1 receptors on Na^+/K^+ -ATPase activity in mice hippocampal slices and the possible mechanisms involved in such an effect.

Experimental Procedures

Reagents

Montelukast (a CysLT1R selective antagonist) and LTD4 (CysLTR agonist) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Montelukast was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in apyrogenic sterile saline, in such a way that DMSO concentration did not exceed 0.5%. LTD4, supplied as a solution in ethanol, was diluted in sterile apyrogenic saline in such a way that ethanol concentration did not exceed 1%. Anti-CysLT1R was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Inc., Santa Cruz, CA, USA). PKC inhibitor GF-109203X was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade and purchased from local suppliers.

Animals

Adult male Swiss mice (from the animal house of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil) weighing 25 ± 3.5 g were used. The animals were kept under standard conditions of temperature and humidity (12h light/dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food and water. The experimental protocol was approved by Institutional Animal Ethics Committee and conducted according with policies of National Institutes of Health Guide for the care and use Laboratory Animals (Nº 69/2010). Experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as described by Upreti and colleagues (2012) with minimal modifications. Mice were killed by cervical dislocation, decapitated, and had their brains quickly removed, hemisected in ice-cold sucrose-based cutting solution (Bischofberger et al., 2006) in mM: 87 NaCl, 25 NaHCO₃, 25 glucose, 75 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂ and 7 MgCl₂ (equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂), and 350–370 mm thick horizontal brain slices cut with a vibratome (Leica VT1000 S). Slices were transferred to assay tubes containing artificial CSF (in mM: 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl, 2.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose) and incubated in room temperature for 60 min for stabilization of slices. The effect of CysLT1R agonist (LTD4 1, 10 or 100 nM) on hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity was investigated by incubating 6-8 slices for 30 min at 37°C with increasing concentrations of drug. After the incubation period, the medium was discarded and slices were gently homogenized (10–12 strokes) in ice-cold 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity. In a separate

set of experiments, LTD4 (1, 10 or 100 nM) was added directly to the reaction medium containing hippocampal homogenates, in order to determine whether LTD4 decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity by directly interacting with the enzyme. Moreover, we also investigated the effect of selective antagonist for CysLT1 receptor (montelukast 1, 10 or 100 µM). Moreover, we investigated whether montelukast (1 µM), at dose that caused no effect *per se*, reversed the effect of LTD4 (10 nM) on decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity, for this, hippocampal slices were incubated for 15 min with montelukast (1 µM), and then LTD4 (10 nM) was added to the incubation medium. Furthermore, in order to make sure that LTD4 was binding CysLT1 receptor, we incubated slices with anti-CysLT1 antibody (1:1000) or boiled anti-CysLT1 antibody (1:1000), as an additional control, in presence or absence of LTD4 (10 nM).

Since the CysLT1 receptor is a Gq-coupled protein, we also investigated the effect of PKC inhibitor GF-109203X (0.03, 0.3 or 3 µM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices. In those experiments designed to investigate the role of PKC in the LTD4-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity, hippocampal slices were incubated for 15 min with PKC inhibitor (GF-109203X, 0.3 µM), and then LTD4 (10 nM) was added to the incubation medium, as described above.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements

Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured according to Wyse et al. (2000). Briefly, the assay medium consisting of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 5 mM KCl; 6 mM MgCl₂ and 50 g of protein in the presence or absence of ouabain; summing up to a final volume of 250 µL. We determined effect of LTD4, pentylenetetrazole or LTD4 plus pentylenetetrazole on ouabain-sensitive ATPase activity using 3 µM or 4 mM ouabain (so as to inhibit only the Na⁺,K⁺-ATPase isoforms containing 2 and 3 subunits, or to inhibit every isoform, respectively. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 50 µL of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturated substrate concentrations were used and the reaction was linear with protein (1 mg/mL) and time (30 min). Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified colorimetrically, as described by Fiske and Subbarow (1925), using KH₂PO₄ as a

reference standard. Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

Ex vivo experiments

To determine whether the LTD4-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity also occurs ex vivo, mice were anesthetized ketamine/xylazine (50/5 mg/kg, i.p.) and a cannula was inserted bilaterally into the lateral ventricles (coordinates relative to bregma: L= +0.9, V= -1.6) (Paxinos and Franklin, 2001) with a stereotaxic device. The cannulas were fixed to the skull with dental acrylic cement. Ceftriaxone (100 mg/kg, i.p.) and meloxicam (2 mg/Kg, i.p.) were administrated immediately before the surgical procedure. Seven days after the surgical procedure, animals were injected with LTD4 (2 pmol/3 µL, i.c.v.), and 30 min thereafter Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined in hippocampal homogenates. Doses of LTD4 used in this set experiments were chosen based on previous studies (Lenz et al., 2014).

Protein determination

Protein contents were determined using the Pierce bicinchoninic acid (BCA) method (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)

Statistical analysis

Data were analyzed by a one- or two-way ANOVA, and Student's t-test as appropriate. Post hoc analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls test or Bonferroni's test, when appropriate. A probability of p < 0.05 was considered significant. All data are expressed as mean ± SEM.

Results

In order to evaluate the effect of CysLT1 receptor on Na⁺,K⁺-ATPase activity, we firstly performed a dose-effect curve of LTD4, main CysLT1 agonist. For this, was used a classical pharmacological technique that evaluates different isoforms enzyme activity. Thereby, Figure 1 shows a concentration-response experiment for LTD4 (1, 10 or 100 nM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices. Statistical

analysis revealed that incubation with LTD4 (10 nM) decreased total Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices [$F(3,8)=4,46$; $p<0,05$; Fig. 1A]. We also investigated whether some isoform is selectively inhibited by LTD4. For this purpose, we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al. 1999). We determined whether LTD4 inhibited ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μM (that inhibits Na⁺,K⁺-ATPase isoforms containing alpha 2 and alpha 3 subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms). We found that the inhibitory effect of LTD4 on Na⁺,K⁺-ATPase activity is isoform-specific, i.e. LTD4 (10 nM) inhibited alpha 1 isoform [$F(3,8)=6,44$; $p<0,05$; Fig. 1B]. In the other hand, alpha 2 and alpha 3 subunits were inhibited only at a dose 10-folds higher (100 nM) [$F(3,8)=6,51$; $p<0,05$; Fig. 1C].

Figure 2 shows the results of the experiment designed to investigate whether LTD4 (1, 10 or 100 nM) altered Na⁺,K⁺-ATPase activity by directly interacting with the enzyme in hippocampal homogenates. In this experimental condition LTD4 did not decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity, suggesting that LTD4-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity is not because of a direct effect on the enzyme and requires intact cells.

Moreover, we also performed a dose-effect curve of CysLT1R inverse agonist, montelukast. Figure 3 shows the effect of increased doses of montelukast (1, 10 or 100 μM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices. Statistical analysis revealed

that montelukast at 10 μM, increased only alpha 2 and alpha 3 Na⁺,K⁺-ATPase subunits activity [$F(3,28)=10,73$; $p<0,05$, Fig. 3B], while total Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(3,28)=7,81$; $p<0,05$, Fig. 3A] and alpha 1 subunit activity were inhibited only at dose 10-fold higher, i.e., 100 μM [$F(3,28)=7,97$; $p<0,05$; Fig. 3C].

If the actions CysLTR agonist, LTD4 were due to a interaction with CysLT1 receptor their actions should be reverted by montelukast. We investigated this possibility adding montelukast at dose that had no *per se* effect (1 μM) to the incubation medium slices 15 min after LTD4 (10 nM), as showed in Figure 4. Statistical analysis revealed that montelukast reversed the effect of LTD4 on the Na⁺,K⁺-ATPase total activity [$F(1,12)=22,04$; $p<0,05$, Fig. 4A], as well as alpha 1 [$F(1,12)=29,97$; $p<0,05$, Fig. 4B] and alpha 2,3 [$F(1,12)=21,74$; $p<0,05$, Fig. 4C] Na⁺,K⁺-ATPase subunit activity in mice hippocampal slices.

To determine whether the LTD4-induced decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity

occurred *in vivo*, mice were injected with LTD4 (2 pmol/3 µL; i.c.v.) at dose that did not alter animal behavior *per se* (Lenz et al., 2014) and Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined in the hippocampus. In the present study we did not detect any effect of LTD4 on the behavior of the animals (data not show). However, statistical analysis revealed that the i.c.v. injection of LTD4 decreased total Na⁺,K⁺-ATPase activity ($t=4.11$; $p<0.05$, Fig. 5A; $n=6$), and both alpha 1 ($t=2.85$; $p<0.05$, Fig. 5B) and alpha 2 ($t=2.88$; $p<0.05$; Fig. 5C), confirming the results obtained *in vitro*.

Figure 6 shows the effect of anti-CysLT1R antibody (1:1000) or boiled anti-CysLT1R antibody (1:1000), in presence or absense of LTD4 (10 nM), in mice hippocampal slices. Statistical analysis revelead that addition of anti-CysLT1R to incubation medium prevented the LTD4-induced decreased Na⁺,K⁺-ATPase total activity [$F(1,12)=177.1$; $p<0.05$; Fig. 6A] as well as alpha 1 [$F(1,12)=59.44$; $p<0.05$; Fig. 6B] and alpha 2/3 [$F(1,12)=98.63$; $p<0.05$; Fig. 6C] subunits. In the other hand, both slices treatd with anti-CysLT1R boiled plus LTD4 (10 nM) and treated only with LTD4 (10 nM) , the Na⁺,K⁺-ATPase activity was decreased.

Since the CysLT1 receptor is a Gq-coupled protein, we also investigated the effect of PKC inhibitor GF 109203X (0.03, 0.3 or 3 µM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices. Figure 7 shows concentration-effect curve for PKC inhibitor, GF 109203X. Statistical analysis revelead that GF 109203X 3 µM was able of incresed total Na⁺,K⁺-ATPase activity [$F(3,12)=41,72$; $p<0.005$; Fig. 7A] and also, specifically, of alpha 1 subunit [$F(3,12)=20,08$; $p<0.005$; Fig.7B]. In order to confirm that actions LTD4 were due to a interaction with CysLT1 receptor, we investigated wether a PKC inhibitor, GF-109203X could prevent this actions, since CysLT1 is G protein-coupled receptor . For this, we added GF-109203X (0,3 µM) at dose that has no effect *per se* on Na⁺,K⁺-ATPase activity, to the incubation medium slices 15 min before LTD4 (10 nM). Figure 8 shows that GF-109203X prevented, although partially, LTD4-induced decrease Na⁺,K⁺-ATPase total activity [$F(1,24)= 29,9$; $p<0.05$; Fig. 8A] and also alpha 1 subunit [$F(1,24)=49,35$; $p<0.05$; Fig. 8B], specifically. This partial reversion suggests there may be another pathway, beyond to CysLT1 receptor activation, which LTD4 decreases the Na⁺K⁺-ATPase activity.

Discussion

In the present study we showed that incubation with LTD4 decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices, and that this effect is isoform-specific. The inhibitory effect of LTD4 on Na⁺,K⁺-ATPase activity was not observed in hippocampal homogenates, indicating that it requires intact cells. Moreover, we showed that LTD4-induced decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity was reversed by CysLT1R inverse agonist, montelukast. In addition, we also showed that possibly the PKC activation pathway is involved in LTD4-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices, since PKC inhibitor, GF 109203X, blunted such an effect. Importantly, we also showed that LTD4 effect on Na⁺,K⁺-ATPase activity *in vitro* also occurred *ex vivo*, confirming the biological importance of the current results.

In the last decade a significant number of studies have proposed a role for CysLT1 receptor in several brain diseases. Increased leukotrienes levels, as well as CysLT1 activation, have been associated with deleterious increases in cerebral excitability and development of inflammatory process, which occurs in several conditions, as Parkinson's disease (Chou et al., 2013), ischaemia (Zhang et al, 2013) and epilepsy (Rehni and Singh, 2011). In fact, in a model of brain cryoinjury induced by liquid nitrogen-cooled metal probe, the expression of CysLT1 receptor was upregulated in the brain 6-24 h after cryoinjury and was primarily localized in the neurons. Furthermore, pre-injury treatment with multi- and single-dose of pranlukast, a CysT1 receptor antagonist, attenuated cryoinjury. Moreover, a single-dose of pranlukast given 30 min after cryoinjury was also effective. These findings suggest that CysLT1 receptors may be involved in injury induced by liquid nitrogen in mice, at least partly (Ding, et al., 2007).

Moreover, Ozkan and colleagues (2010) investigated the effect of montelukast, a CysLT1 receptor inverse agonist, on cerulein-induced acute pancreatitis in rats. Acute pancreatitis induced a significant decrease both in tissue glutathione level and Na⁺,K⁺-ATPase pancreatic activity, which were accompanied with significant increases in the pancreatic malondialdehyde level, myeloperoxidase activity, and plasma cytokine level. On the other hand, pre-treatment with montelukast reversed all these biochemical changes as well as protected against cerulein-induced Na⁺,K⁺-ATPase activity decrease. These results suggest that cysteinyl leukotrienes may be involved in the pathogenesis of acute pancreatitis and that montelukast might be of

therapeutic value for the treatment of diseases that present a decrease on Na⁺,K⁺-ATPase activity, because its use has established safety and efficacy, commercially. These data, together as our findings, showed that montelukast can reverse a decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity in different tissues.

Since lipoxygenase metabolites are among the endogenous regulators of Na⁺,K⁺-ATPase, Singh and colleagues (2012) examined whether arachidonic acid inhibits vascular Na⁺,K⁺-ATPase in pulmonary vasculature, and if so, what are the mechanisms involved. For this purpose, functional Na⁺,K⁺-ATPase activity was studied in terms of K(+)-induced relaxation in sheep pulmonary arterial rings contracted with K(+)-free solution and 5-HT. Arachidonic acid caused concentration-dependent inhibition of KCl-induced relaxations, which shows a decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity, since this relaxation is induced by functional Na⁺,K⁺-ATPase activation. Moreover, norhydriohydroguaiaretic acid (NDGA), a lipoxygenase inhibitor, restored, partially, the relaxation to K(+), impaired in the presence of arachidonic acid and staurosporin, a protein kinase C inhibitor, completely reversed the inhibitory effect of arachidonic acid on K(+)-induced relaxation. This suggests a involvement of protein kinase C on inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by arachidonic acid in sheep pulmonary artery. In this study we also evidenced the involvement of PKC via on Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus. Since that CysLT1 are G-protein coupled receptors, we show that inhibition of PKC activation prevents the LTD4-induced decrease Na⁺,K⁺-ATPase.

In line this view, in our work showed that LTD4, from 5-HPETE by 5-LOX action, inhibited the hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity. On the other hand, Koid and colleagues (1986) evidenced that 15-HPETE, from 15-LOX action, markedly stimulated these ATPase activity of blood-brain barrier using rat brain microvessels, whereas the synaptosomal Na⁺,K⁺-ATPase activity was inhibited in a dose-dependent manner (Koid et al., 1986). These findings corroborate with the literature, since it shows that various derivatives of the AA cascade can modulate the Na⁺,K⁺-ATPase activity.

In this sense, the direct effect of lipoxygenase on Na⁺,K⁺-ATPase activity was assessed, *in vitro*, using soybean lipoxygenase. Treatment of Na⁺,K⁺-ATPase (from dog kidneys) with 4.2 microg/mL of soybean lipoxygenase caused 20+/-2% inhibition of ATPase activity. A 10-fold increase in lipoxygenase concentration led to 30+/-0.3% inhibition. In the presence of phenidone (a lipoxygenase inhibitor) inhibition of

Na⁺,K⁺-ATPase activity was blocked and an increase in ATPase activity was observed. Moreover, presence of lipoxygenase enhanced the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by ouabain. These findings suggest that lipoxygenase may modulate Na⁺,K⁺-ATPase (Kumarathasan and, Leenen, 2000).

Arachidonic acid metabolites are important, also, as modulators tubular Na⁺,K⁺-ATPase activity. Given this, Li and colleagues (2000) examined the AA metabolic pathways regulating Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats. The lipoxygenase metabolite 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) inhibited Na⁺,K⁺-ATPase activity, and this inhibition was blocked by the 12-lipoxygenase inhibitor, baicalein. Interestingly, 12-HETE inhibited Na⁺,K⁺-ATPase in a protein kinase C-dependent manner. Moreover, it has also been demonstrated that 5-HPETE is a potent inhibitor of neuronal Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomal preparations from rat cerebral cortex. 5-HPETE inhibited Na⁺,K⁺-ATPase by up to 67 %. In contrast, 12-HPETE and 15-HPETE did not inhibit Na,K,ATPase activity. It is proposed that 5-HPETE production by 5-lipoxygenase and subsequent inhibition of neuronal Na⁺,K⁺-ATPase activity may be a mechanism for modulating synaptic transmission (Foley, 1997).

Since it is well established that AA metabolites can regulate Na⁺,K⁺-ATPase activity in several tissues, one might suggest that LTD4, and, accordingly, CysLT1 receptor, may also be a physiological regulator of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus. However, this discussion is speculative in nature, and further studies are necessary to elucidate this point.

In summary, in this study we showed that incubation with LTD4 decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices and that the i.c.v. injection of this leukotriene decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity also *in vivo*. A possible mechanism for this effect involve CysLT1 and PKC activation. These findings support a putative mechanism by which inflammation may increase brain excitability and may represent a new target for drug development for neurological disorders in which inflammation plays a role.

Figures:

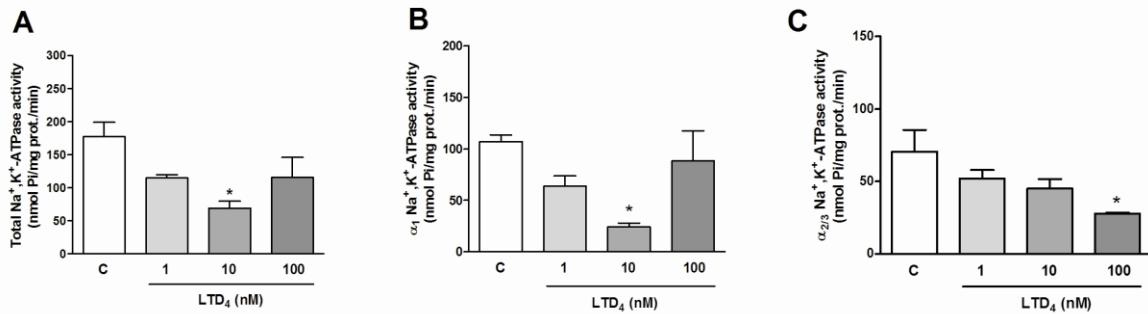


Figure 1 - Effect of incubation with LTD4 (1, 10 or 100 nM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice hippocampal slices. Total Na⁺,K⁺-ATPase activity was inhibited by LTD4 10 nM (A); Alpha 1(B) and alpha 2,3 (C) subunits were inhibited by 10-fold higher dose (100 nM). Data expressed as mean and standard deviation; *p<0,05 vs control group.

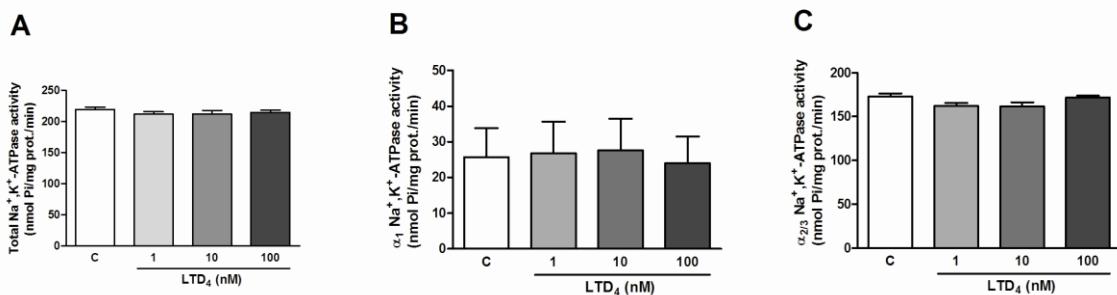


Figure 2 - Effect of incubation with LTD4 (1, 10 or 100 nM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice total hippocampal homogenate. LTD4 had no effect on Na⁺,K⁺-ATPase activity at any tested dose. Data expressed as mean and standard deviation.

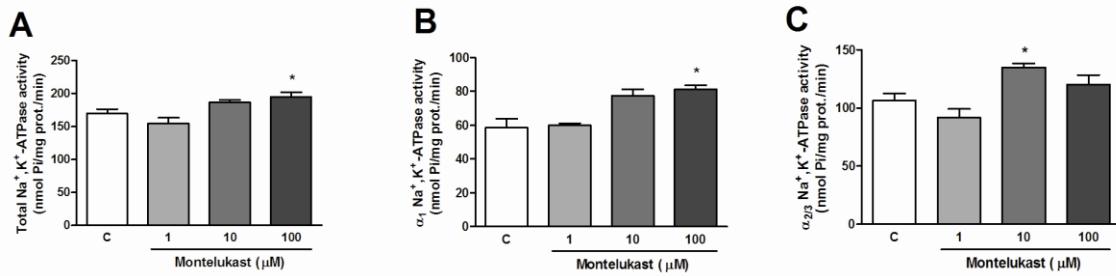


Figure 3 - Effect of incubation with montelukast (1, 10 or 100 μ M) on Na^+,K^+ -ATPase activity in mice hippocampal slices. Total Na^+,K^+ -ATPase activity (A) and alpha 1 subunit (B) were inhibited by montelukast 100 μ M, while alpha 2,3 (C) subunits were inhibited by 10-fold lower dose (10 μ M). Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0,05$ vs control group.

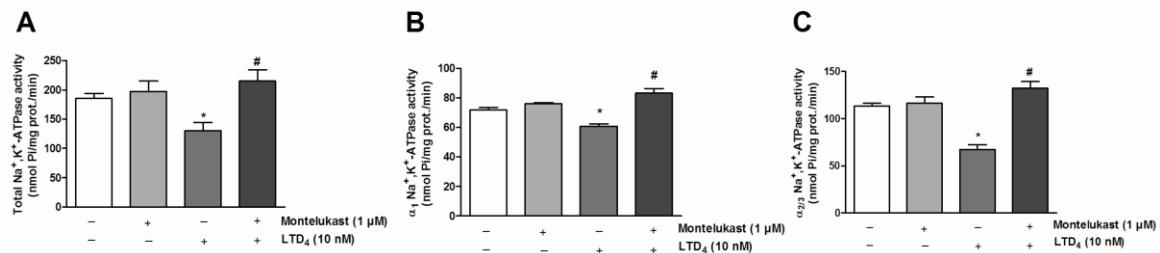


Figure 4 – Montelukast (1 μ M) reverses LTD4-induced decrease Na^+,K^+ -ATPase activity in mice hippocampal slices. Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0,05$ vs control group; # $p<0,05$ vs LTD4 group.

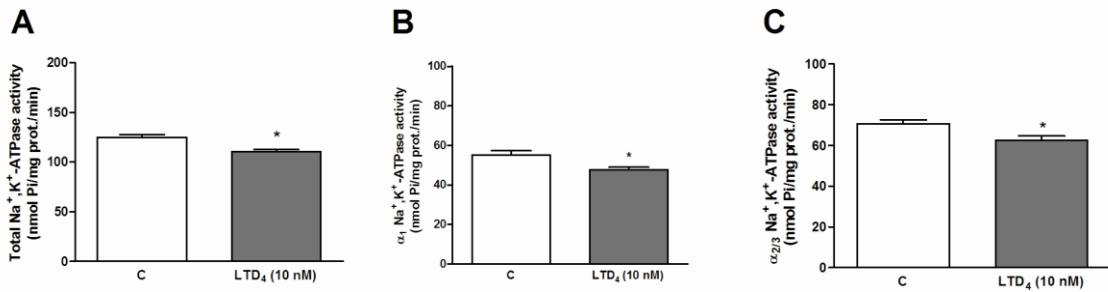


Figure 5 – Effect of the intracerebroventricular injection of LTD4 (2 pmol/3 µL; i.c.v.) on Na₊,K₊-ATPase activity in mice hippocampus in vivo. Data are mean + SEM for n = 6 in each group. * p<0,05 control group.

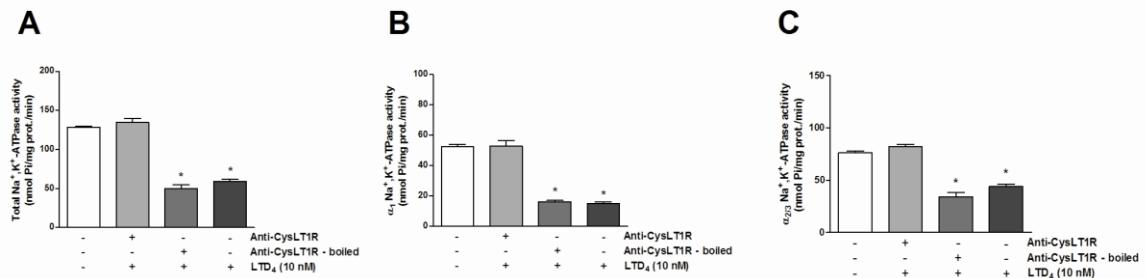


Figure 6 – Effect of anti-CysLT1 antibody on Na₊,K₊-ATPase activity in mice hippocampal slices incubated with LTD4 (10 nM). Anti-CysLT1 prevent LTD4-induced decrease total Na₊,K₊-ATPase activity as well as all subunits. Data expressed as mean and standard deviation; *p<0,05 vs control group.

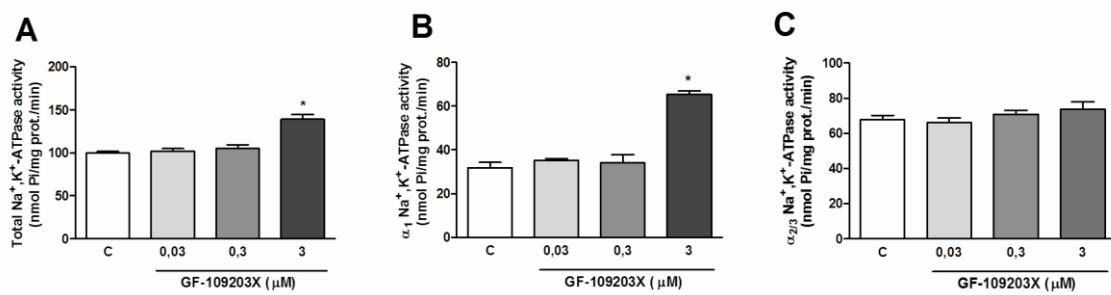


Figure 7 - Effect of incubation with GF-109203X (0.03, 0.3 or 3 μ M) on Na^+,K^+ -ATPase activity in mice hippocampal slices. Total Na^+,K^+ -ATPase activity (A) and alpha 1 subunit (B) were inhibited by GF-109203X 3 μ M, while alpha 2,3 (C) subunits were not inhibited by any dose tested. Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0,05$ vs control group.

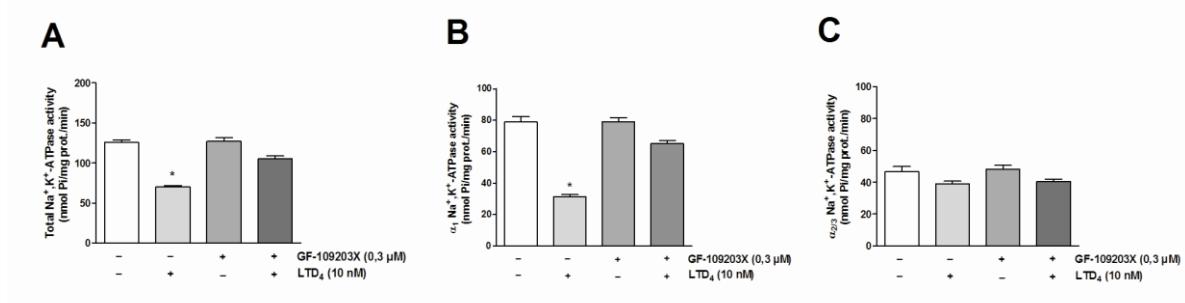


Figure 8 - GF-109203X (0,3 μ M) prevents LTD4-induced decrease Na^+,K^+ -ATPase activity in mice hippocampal slices. The effect was observed in total and alpha 1 subunit Na^+,K^+ -ATPase activity, but not in the alpha 2 and 3 subunits. Data expressed as mean and standard deviation; * $p<0,05$ vs control group.

References

- Aperia A. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺K⁺-adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol.* 2012 ; 23(8):1283-90.
- Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, Jonas P. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc.* 2006; 1(4):2075-81.
- Chou VP, Holman TR, Manning-Bog AB. Differential contribuition of lipoxygenase isozymes to nigrostriatal vulnerability. *Neuroscience* 2013; 228:73-82.
- Ding Q1, Fang SH, Zhou Y, Zhang LH, Zhang WP, Chen Z, Wei EQ. Cysteinyl leukotriene receptor 1 partially mediates brain cryoinjury in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(7):945-52.
- Farias, S., Frey, L., Murphy, R., Heidenreich, Kim. Injury-Related Production of Cysteinyl Leukotrienes Contributes to Brain Damage following Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma.* 2009; 26:1977–1986.
- Fiske C. H. and Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925; 66, 375–400.
- Firuzi O, Zhuo J, Chinnici CM, Wisniewski T, Praticò D. 5-Lipoxygenase gene disruption reduces amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb J.* 2008 ; 22(4):1169-78.
- Foley, TD. 5-HPETE Is a Potent Inhibitor of Neuronal Na⁺,K⁺-ATPase Activity. *Bioch. and Bioph. Res. Com.* 1997; 235, 374–376.
- Hedi H, Norbert G. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J Biomed Biotechnol* 2004; 99-105.
- Horisberger, JD. Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump. *Physiology.* 2004 ; 19: 377–387.
- Kim HC, Jhoo WK, Bing G, Shin EJ, Wie MB, Kim WK, Ko KH. Phenidone prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. *Brain Res* 2000; 874: 15-23.
- Koide T, Asano T, Matsushita H, Takakura K. Enhancement of ATPase activity by a lipid peroxide of arachidonic acid in rat brain microvessels. *J Neurochem.* 1986; 46(1):235-42.
- Kumarathasan R, Leenen FH. Effects of soybean lipoxygenase on Na⁺/K⁺-ATPase activity in vitro. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000;78(9):691-5.
- Lenz QF, Arroyo DS, Temp FR, Poersch AB, Masson CJ, Jesse AC, Marafiga

JR, Reschke CR, Iribarren P, Mello CF. Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. *Neuroscience*. 2014 (in press).

Li D, Belusa R, Nowicki S, Aperia A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na⁺,K⁺-ATPase are age dependent. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 278(5):F823-9.

Nishi A., Fisone G., Snyder G. L., Dulubova I., Aperia A., Nairn A. C. and Greengard P. Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J. Neurochem*. 1999; 73, 1492–1501.

Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem*. 2009 ; 109(2):416-26

Oliveira, M. S., Furian, A. F., Rambo, L. M., Ribeiro, L. R., Royes, L. F., Ferreira, J., Calixto, J. B., Mello, C. F. Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience*. 2008; 152, 1110-8.

Ozkan E, Akyüz C, Sehirli AO, Topaloğlu U, Ercan F, Sener G. Montelukast, a selective cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, reduces cerulein-induced pancreatic injury. *Pancreas*. 2010; 39(7):1041-6.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Second edition, 2001. San Diego, USA.

Rehni AK1, Singh TG. Modulation of leukotriene D4 attenuates the development of seizures in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011 ; 85(2):97-106.

Salvadori MG, Banderó CR, Jesse AC, Gomes AT, Rambo LM, Bueno LM, Bortoluzzi VT, Oliveira MS, Mello CF. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. *Epilepsia*. 2012 ; 53(1):189-98

Simmet T, Tippler B. Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. *Brain Res* 1990 ; 515: 79-86.

Singh TU, Choudhury S, Parida S, Maruti BS, Mishra SK. Arachidonic acid inhibits Na⁺,K⁺-ATPase via cytochrome P-450, lipoxygenase and protein kinase C-dependent pathways in sheep pulmonary artery. *Vascul Pharmacol*. 2012 ;56(1-2):84-90

Zhang XY, Wang XR, Xu DM, Yu SY, Shi QJ, Zhang LH, Chen L, Fang SH, Lu YB, Zhang WP, Wei EQ. HAMI 3379, a CysLT2 receptor antagonist, attenuates

ischemia-like neuronal injury by inhibiting microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 346(2):328-41.

Zhao R, Shi WZ, Zhang YM, Fang SH, Wei EQ. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, attenuates chronic brain injury after focal cerebral ischaemia in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63: 550-557.

Zhu L, Maruvada R, Sapirstein A, Malik KU, Peters-Golden M, Kim KS. Arachidonic acid metabolism regulates *Escherichia coli* penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun* 2010; 78: 4302-4310.

5 DISCUSSÃO

A epilepsia é uma doença neurológica, caracterizada por crises recorrentes não provocadas. O tipo de crise epiléptica vai depender da porção do cérebro que foi afetada. As causas das crises são diversas e vão desde tumor cerebral, traumatismo crânio-encefálico, infarto, inflamação, até síndrome de abstinência alcoólica (VEZZANI, 2005; VEZZANI et al., 2008; FABENE et al., 2010). Os tratamentos convencionais da epilepsia consistem, primeiramente, em medicações anticonvulsivantes e, embora esses fármacos possam reduzir ou controlar a frequência das crises, alguns pacientes apresentam pouca ou nenhuma melhora clínica. Em cerca de 30% dos indivíduos afetados, a epilepsia é refratária ao tratamento farmacológico, e a remoção cirúrgica do foco epiléptico somente é indicada para uma minoria deles (ENGEL e PEDLEY, 2008).

Dessa forma, o descobrimento de terapias alternativas com propósito anticonvulsivante, bem como a elucidação dos eventos moleculares subjacentes à ocorrência de crises é salutar para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Os dados experimentais, bem como evidências baseadas em pesquisas clínicas indicam que as crises podem causar diversas consequências, que vão desde danos neuronais leves a comprometimento cognitivo grave. No entanto, os mecanismos moleculares que medeiam tais crises não estão totalmente esclarecidos (GABY, 2007; FISCHER et al., 2014).

Nesse sentido, a primeira parte deste trabalho propôs-se a investigar o efeito de uma droga já usada na clínica médica – o montelucaste – sobre as crises induzidas em modelo experimental com camundongos. Ele é indicado em casos de asma, por inibir a ação dos leucotrienos, os principais responsáveis pela bronco constrição. Baseado no fato de que as crises estão estreitamente relacionadas com a presença de processo inflamatório e que o mecanismo de ação do montelucaste é exatamente inibir a ação de um tipo específico de mediador inflamatório, os leucotrienos, assim, supomos que essa droga poderia apresentar atividade anticonvulsivante em modelo experimental. Uma vez que esse efeito foi observado, supomos também outra correlação, baseando-nos em estudos prévios (KIM et al.,

2009; WANG et al., 2011), a de que o montelucaste estaria, concomitantemente, exercendo efeito protetor sobre a barreira hematoencefálica (BHE).

A abordagem acerca do efeito anticonvulsivante do montelucaste encontra-se detalhada no Manuscrito I, na qual é descrita a prevenção do desenvolvimento de crises pelo pré-tratamento com montelucaste. O modelo de crise induzida por pentilenotetrazol (PTZ) baseia-se no antagonismo de receptores inibitórios GABA (ácido gama-aminobutírico). Esse modelo foi eleito em virtude de apresentar alto valor preditivo na clínica e pouca ou nenhuma neurodegeneração associada (Yang and Frankel, 2004; PITKÄNEN et al., 2006; CREMER et al., 2009; LÖSCHER, 2009). Além do montelucaste, outros antagonistas dos receptores de leucotrienos foram testados. Primeiramente, utilizou-se o Bay-u9773, uma droga capaz de se ligar igualmente nos dois subtipos dos receptores (CysLT1 e CysLT2).

Uma vez que esse antagonista dual apresentou efeito anticonvulsivante esperado, decidimos investigar se o receptor CysLT1 era o responsável por mediar tal efeito. Para isso, usamos um antagonista seletivo para esse receptor, primeiramente o montelucaste, o qual foi capaz de aumentar a latência para desenvolvimento de crises. A fim de descartar um efeito inespecífico dessa droga, também testamos outra droga da mesma classe, o pranlucaste. Conforme esperado, um efeito anticonvulsivante semelhante foi observado com ambos os tratamentos. Para nos certificarmos de que esse efeito era realmente devido à inibição dos receptores CysLT1, administramos, concomitantemente com montelucaste, um agonista desse receptor, o LTD4, a fim de obter uma reversão do efeito anticonvulsivante do antagonista. Os resultados demonstram que o LTD4 reverteu o efeito do montelucaste.

Uma vez avaliado o efeito do antagonista CysLT1 sobre as crises, investigamos um possível mecanismo de ação envolvido neste efeito. Visto que já se tem estabelecido que o montelucaste previne a ruptura da BHE em outros modelos experimentais, decidimos verificar se essa droga também manteria a integridade da barreira no modelo de crises induzidas por PTZ, bem como se sua ação sobre a BHE estaria correlacionada com seu efeito anticonvulsivante. Para isso, usamos uma técnica que avalia a integridade da barreira durante e após o desenvolvimento de tais crises. Essa técnica baseia-se na percentagem de fluoresceína de sódio que penetra no cérebro em relação a uma determinada quantidade injetada intraperitonealmente. Os resultados obtidos mostraram que o

pré-tratamento com montelucaste preveniu a ruptura da BHE provocada pelo PTZ. A seguir testamos se o efeito protetor sobre a BHE poderia ser revertido por LTD4, um agonista dos receptores CysLT1. Porém, tal reversão só foi observada com uma dose mais elevada do agonista. A partir disso, verificamos uma possível relação entre o índice de fluorescência cérebro/soro e as latências para o desenvolvimento de crises, quando observamos uma correlação altamente significativa entre os dois parâmetros.

Por fim, através da microscopia confocal, mostramos que o tratamento com LTD4 aumentou a infiltração leucocitária no encéfalo, e que, por outro lado o montelucaste foi capaz de reduzir o número de células positivas para CD45/IgG, evidenciando um efeito protetor do montelucaste sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Tendo em vista os resultados apresentados até aqui, não é possível estabelecer uma relação de causa-efeito entre a proteção da BHE e o efeito anticonvulsivante do montelucaste. Pois, se o efeito anticonvulsivante dependesse da integridade da BHE, estes efeitos não deveriam ser dissociáveis. De fato, as doses baixas de LTD4 (0,2 e 2 pmol), preveniram o efeito anticonvulsivante, mas não o efeito protetor do montelucaste sobre a BHE. Essa observação sugere que a manutenção da integridade da BHE não determina o efeito anticonvulsivante do montelucaste.

Tendo por base todos os dados da literatura que suportam o papel dos leucotrienos cisteínicos na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, nas quais a excitotoxicidade esteja envolvida, bem como os achados descritos no Manuscrito I, na segunda parte deste trabalho, investigamos o envolvimento dos receptores CysLT1 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo de camundongos, como um possível mecanismo de ação para na facilitação da hiperexcitabilidade, uma vez que ainda pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual os leucotrienos facilitam a atividade excitatória.

Para isso, primeiramente, avaliamos o efeito da incubação com LTD4, agonista CysLT1, sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, usando fatias de hipocampo de camundongos. Paralelamente, também investigamos o efeito desse agonista quando adicionado diretamente ao meio de reação contendo um homogeneizado total de hipocampo, a fim de descartar a hipótese de que os leucotrienos estivessem agindo por uma interação direta com a enzima, e não por desencadear a cascata de sinalização do receptor. A partir desses experimentos, observamos que o LTD4

diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de hipocampo, porém não tem atividade quando adicionado ao tecido homogeneizado, indicando que essa ação requer a presença da célula intacta, uma vez que a homogeneização do tecido rompe a ancoragem necessária para o funcionamento da maquinaria celular, resultando em desacoplamento dos componenetas modulatórios da enzima.

Além disso, é importante ressaltar que também mostramos o efeito do LTD4 sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase *in vivo*, através da administração i.c.v. em camundongos. Com base nesses achados, e a fim de nos certificarmos de que o LTD4 estava se ligando ao receptor CysLT1, incubamos as fatias com anticorpo anti-CysLT1, e verificamos que, na presença do anticorpo, o LTD4 perde o efeito. Além disso, verificamos também, que o montelucaste, um agonista inverso dos receptores CysLT1, em uma dose que não tem efeito por si só, foi capaz de reverter a diminuição da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase causada pelo LTD4, corroborando com os dados até então encontrados.

Uma vez que o receptor CysLT1 está acoplado a uma proteína Gq, decidimos investigar se o efeito do LTD4 seria mantido se a enzima PKC estivesse inibida. Para isso, incubamos as fatias com GF 109203X, inibidor da PKC, durante 15 minutos, antes de adicionar o LTD4 ao meio, e observamos que o GF 109203X, em uma dose que não tem efeito por si só, preveniu a diminuição na atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase causada pelo LTD4.

Nos últimos anos, um número significante de estudos tem proposto o envolvimento dos leucotrienos cisteínicos em diversas doenças do sistema nervoso central. Um aumento da produção de leucotrienos, bem como a ativação dos receptores CysLT têm sido associados a um efeito prejudicial na excitabilidade cerebral, como ocorre, por exemplo, no trauma crânioencefálico (FARIAS et al., 2009), na encefalite (ZHU et al, 2010), na doença de Parkinson (CHUNG et al., 2013), na isquemia (ZHANG et al, 2013), na dor neuropática (ZHOU et al, 2014) e na epilepsia (REHNI e SINGH, 2011; Lenz et al., 2014), entretanto, os mecanismos que mediavam essa ação não estão totalmente esclarecidos. Assim, este trabalho mostrou evidências do envolvimento dos leucotrienos cisteínicos e da ativação dos seus receptores nas crises epilépticas induzidas por PTZ, no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, bem como a modulação da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase pela ativação desses receptores.

6 CONCLUSÕES

6.1 Parte I – Manuscrito I

- O pré-tratamento com antagonista dual CysLT1/2 (Bay-u9773) e antagonistas seletivos CysLT1 (pranlucaste e montelucaste), via i.c.v., diminui as crises induzidas por PTZ em camundongos, enquanto que o pré-tratamento com Agonista seletivo , via i.c.v, facilita tais crises;
- O pré-tratamento com antagonista seletivo dos receptores CysLT1 (montelucaste), via i.c.v, diminui a permeabilidade da BHE nas crises induzidas por PTZ em camundongos, enquanto que o pré-tratamento com agonista seletivo (LTD4) aumenta essa permeabilidade;
- O efeito anticonvulsivante do antagonista seletivo CysLT1 (montelucaste), via i.c.v, é revertido pelo tratamento com agonista seletivo CysLT1 (LTD4), enquanto que seu efeito protetor sobre a BHE, via i.c.v., não é revertido nas mesmas doses;
- O pré-tratamento com antagonista seletivo CysLT1 (montelucaste), via sistêmica, não apresenta efeito sobre as latências para as crises induzidas por PTZ nem sobre a permeabilidade da BHE, em tais crises;
- A manutenção da integridade da BHE não determina o efeito anticonvulsivante do antagonista seletivo CysLT1 (montelucaste).

6.2 Parte II – Manuscrito II

- A incubação com agonista CysLT1 (LTD4) diminui a atividade da enzima Na+K+ATPase em fatias de hipocampo de camundongos, enquanto que quando adicionado diretamente ao meio contendo homogeneizado total de hipocampo esse efeito não é observado.

- A incubação com agonista CysLT1 (LTD4) não tem efeito sobre a atividade da enzima Na+K+ATPase em fatias de hipocampo de camundongos quando pré-incubadas com anticorpo anti-CysLT1;
- A administração i.c.v. de agonista CysLT1 (LTD4) diminui a atividade da enzima Na+K+ATPase em homogeneizado total de hipocampo de camundongos, ex vivo.
- A incubação com agonista inverso CysLT1 (montelucaste) aumenta a atividade da atividade da enzima Na+K+ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;
- A incubação com agonista inverso CysLT1 (montelucaste), em dose que não tem efeito por si só, reverte a diminuição da atividade da enzima Na+K+ATPase causada pelo agonista (LTD4) em fatias de hipocampo de camundongos;
- A incubação com inibidor da PKC (GF-109203X) aumenta a atividade da atividade da enzima Na+K+ATPase em fatias de hipocampo de camundongos;
- A incubação com inibidor da PKC (GF-109203X), em dose que não tem efeito por si só, reverte a diminuição da atividade da enzima Na+K+-ATPase causada pelo agonista (LTD4) em fatias de hipocampo de camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A. K.; DOLMAN, D. E. M.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**. 2010; 37: 13–25.

ALVES, J. L. Blood-brain barrier and traumatic brain injury. **J Neurosci Res.** 2014 ;92(2):141-7.

AMLANI, S.; NADARAJAH, T.; MCIVOR, R. A. Montelukast for the treatment of asthma in the adult population. **Expert Opin Pharmacother.** 2011;12(13):2119-28.

APERIA, A. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. **J Am Soc Nephrol.** 2012; 23:1283- 90.

ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; MÄE, M.; NISANCIOLLU, M. H.; WALLGARD, E.; NIAUDET, C.; HE, L.; NORLIN, J.; LINDBLOM, P.; STRITTMATTER, K.; JOHANSSON, B. R.; BETSHOLTZ, C. **Pericytes regulate the blood-brain barrier.** Nature. 2010; 25;468(7323):557-61.

ARONICA, E.; BOER, K.; VAN VLIET, E. A.; REDEKER, S.; BAAYEN, J. C.; SPLIET, W. G.; VAN RIJEN, P. C.; TROOST, D.; DA SILVA, F. H.; WADMAN, W. J.; GORTER, J. Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis.** 2007; 26:497-511.

BÄCK, M.; POWELL, W. S.; DAHLÉN, S. E.; DRAZEN, J. M.; EVANS, J. F.; SERHAN, C. N.; SHIMIZU, T.; YOKOMIZO, T.; ROVATI, G. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology Review. Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. **British Journal of Pharmacology.** 2014; 171 3551–3574.

BIBER, N.; TOKLU, H. Z.; SOLAKOGLU, S.; GULTOMRUK, M.; HAKAN, T.; BERKMAN, Z.; AND DULGER, F. G. Cysteinyl-leukotriene receptor antagonist montelukast decreases blood-brain barrier permeability but does not prevent oedema formation in traumatic brain injury. **Brain Inj.** 2009; 23, 577-584.

CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Res Rev.** 2010; 24;64(2):328-63.

CHEBOLU, S.; WANG, Y.; RAY, A. P. and DARMANI, N. A. Pranlukast prevents cysteinyl leukotriene-induced emesis in the least shrew (*Cryptotis parva*). **Eur J Pharmacol.** 2009; 628, 195-201.

CHIAVEGATO, A.; ZUROLO, E.; LOSI G.; ARONICA, E.; CARMIGNOTO, G. The inflammatory molecules IL-1 β and HMGB1 can rapidly enhance focal seizure generation in a brain slice model of temporal lobe epilepsy. **Front Cell Neurosci.** 2014; 6:8:155.

CHOI, J.; NORDLI, D. R. JR.; ALDEN, T. D.; DI PATRI, A. JR.; LAUX, L.; KELLEY, K.; ROSENOW, J.; SCHUELE, S. U.; RAJARAM, V.; KOH, S. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **J Neuroinflammation.** 2009; 19;6:38.

CHU, J.; PRATICO, D. The 5-lipoxygenase as a common pathway for pathological brain and vascular aging. **Cardiovasc Psychiatry Neurol.** 2009; 174657.

CHUNG, Y. C.; KIM, Y. S.; BOK, E.; YUNE, T. Y.; MAENG, S.; JIN, B. K. MMP3 contributes to nigrostriatal dopaminergic neuronal loss, BBB damage, and neuroinflammation in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Mediators Inflamm.** 2013; 370526.

CICCARELLI, R.; D'ALIMONTE, I.; SANTAVENERE, C.; D'AURO, M.; BALLERINI, P.; NARGI, E.; BUCCELLA, S.; NICOSIA, S.; FOLCO, G.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. **Eur J Neurosci.** 2004; 20, 1514–1524.

CICERI, P.; RABUFFETTI, M.; MONOPOLI, A.; NICOSIA, S. Production of leukotrienes in a model of focal cerebral ischaemia in the rat. **Br. J. Pharmacol.** 2001; 133, 1323–1329.

CLASADONTE, J.; HAYDON, P. G. **Astrocytes and Epilepsy in “Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies”**. NCBI Bookshelf Online Book Verison. 4. ed. 2012.

CLAUSEN, T. Na+-K+ Pump regulation and skeletal muscle contractility. **Physiol. Rev.**, 2003; 83(4):1269-324.

COPPOLA, A.; MOSHÉ, S. L. **Animal models**. Handb Clin Neurol. 2012; 107:63-98.

CREMER, C. M.; PALOMERO-GALLAGHER, N.; BIDMON, H. J.; SCHLEICHE, A.; SPECKMANN, E. J.; ZILLES, K. Pentylenetetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**. 2009; 29:163(1):490-9.

DANI, J. W.; CHERNJAVAISKY, A.; SMITH, S. J. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. **Neuron**. 1992; 8, 429–440.

DAVSON, H. Review lecture. The blood-brain barrier. **J Physiol**. 1976; 255(1):1-28.

DENZLINGER, C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. **Crit Rev Oncol Hematol**. 1996; 23, 167-223.

DESJARDINS, P.; SAUVAGEAU, A.; BOUTHILLIER, A.; NAVARRO, D.; HAZELL, A. S.; ROSE, C., BUTTERWORTH, RF. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. **Neurochem Int**. 2003; 42(4):299-303.

DHIR, A.; NAIDU, O. S.; KULKARNI, S. K. **Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice**. Seizure. 2007; 16, 691-697.

DING, Q.; FANG, S. H.; ZHOU, Y.; ZHANG, L. H.; ZHANG, W. P.; CHEN, Z.; WEI E. Q. Cysteinyl leukotriene receptor 1 partially mediates brain cryoinjury in mice. **Acta Pharmacol Sin**. 2007; 28(7):945-52.

DOSTANIC-LARSON, I.; LORENZ, J. N.; VAN HUYSEN, J. W.; NEUMANN, J. C.; MOSELEY, A. E.; LINGREL, J. B. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2006; 290(3):524-8.

ENGEL, J. J.; PEDLEY, T. A. **Epilepsy A Comprehensive Textbook**. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2. ed., 2008.

FABENE, P. F.; NAVARRO, M. G.; MARTINELLO, M.; ROSSI, B.; MERIGO, F.; OTTOBONI, L.; BACH, S.; ANGIARI, S.; BENATTI, D.; CHAKIR, A.; ZANETTI, L.; SCHIO, F.; OSCULATI, A.; MARZOLA, P.; NICOLATO, E.; HOMEISTER, J. W.; XIA, L.; LOWE, J. B. , MCEVER RP, OSCULATI, F, SBARBATI, A, BUTCHER, EC, CONSTANTIN, G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nat Med**. 2008; 14, 1377-1383.

FARIAS, S.; FREY, L.; MURPHY, R.; HEIDENREICH, K. I. M. Injury-Related Production of Cysteinyl Leukotrienes Contributes to Brain Damage following Experimental Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma.** 2009; 26:1977–1986.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLOU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J. JR.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia.** 2014; 55(4):475-82.

FOLEY, T. D. 5-HPETE Is a Potent Inhibitor of Neuronal Na⁺K⁺-ATPase Activity. **Bioch. and Bioph. Res. Com.** 1997; 235, 374–376.

FRIEDMAN, A. Blood–brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: A puzzle of a chicken and egg? **Epilepsia.** 2011; 52(8):19–20.

FRIEDMAN, A., KAUFER, D. AND HEINEMANN, U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. **Epilepsy Res.** 2009; 85, 142-149.

GABY, A. R. Natural Approaches to Epilepsy. **Alternative Medicine Review.** 2007; 12.

GEERING, K. FXYD proteins: new regulators of Na⁺,K⁺-ATPase. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 2006; 290(2):241-250.

GIANNATSELIS, H.; CALDER, M.; WATSON, A. J. Ouabain stimulates a Na⁺K⁺-ATPase-mediated SFK-activated signalling pathway that regulates tight junction function in the mouse blastocyst. **PLoS One.** 2011; 6(8):23704.

ALBUQUERQUE, G. DE, C. F.; BURTH, P.; SILVA, A. R.; DE MORAES, I. M.; OLIVEIRA, DE J. F. M.; SANTELLI, R. E.; FREIRE, A. S.; BOZZA, P. T.; YOUNES-IBRAHIM, M.; DE CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE CASTRO, F. M. V. Oleic acid inhibits lung Na⁺K⁺-ATPase in mice and induces injury with lipid body formation in leukocytes and eicosanoid production. **J Inflamm.** 2013; 31; 10(1):34.

GREENWOOD, J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. **Neuroradiology.** 1991; 33(2):95-100.

GRISAR, T.; ESCUETA, D. A. V. Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K⁺ activation of Na⁺,K⁺-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. **Brain Res.** 1986; 364, 1-11.

HALASSA, M. M.; HAYDON, P. G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annu Rev Physiol.** 2010; 72:335–355. HAWKINS BT, DAVIS TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol Rev.** 2005; 57(2):173-85.

HAYAKAWA, K.; PHAM, L. D.; ARAI, K.; LO, E. H. High-mobility group box 1: an amplifier of stem and progenitor cell activity after stroke. **Acta Neurochir Suppl.** 2013; 118:31-8.

HEDI, H.; AND NORBERT, G. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. **J Biomed Biotechnol.** 2004; 99-105.

HEINEMANN, U.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A. **Blood-Brain Barrier Dysfunction, TGF-β Signaling, and Astrocyte Dysfunction in Epilepsy.** **Glia.** 2012; 60(8):1251-1257.

HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology (Bethesda).** 2004;19:377-87.

HU, H. H.; BIAN, Y. C.; LIU, Y.; SHENG, R.; JIANG, H. D.; YU, L. S.; HU, Y. Z.; ZENG, S. Evaluation of blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier permeability of 2-phenoxy-indan-1-one derivatives using in vitro cell models. **Int J Pharm.** 2014; 2;460(1-2):101-7.

HUANG, X. Q.; ZHANG, X. Y.; WANG, X. R.; YU, S. Y.; FANG, S. H.; LU, Y. B.; ZHANG, W. P.; WEI, E. Q. Transforming growth factor β1-induced astrocyte migration is mediated in part by activating 5-lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1. **J Neuroinflammation.** 2012; 26:9:145.

IVENS, S.; KAUFER, B.; FORES, L. P.; BECHMANN, I.; ZUMSTEG, D.; TOMKINS, O.; SEIFFERT, E.; HEINEMANN, U.; FRIEDMAN, A. **TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis.** **Brain.** 2007; 130, 535–547.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. **Annu. Rev. Biochem.** 2002; 511-535.

KIM, K. S. **Methods for Treating or Preventing Brain Infections.** In: International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT) (ed. University, T. J. H.), v. WO 2009/152454 A1. n. PCT/US2009/047242, EUA.

KLEEN, J. K.; HOLMES, G. L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med.** 2008; 14, 1309-1310.

KORFF, C. M.; SCHEFFER, I. E. Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. **Curr Opin Neurol.** 2013; 26(2):163-7.

KUMARATHASAN, R.; LEENEN, F. H. Effects of soybean lipoxygenase on Na⁺/K⁺-ATPase activity *in vitro*. **Can J Physiol Pharmacol.** 2000; 78(9):691-5.

LAZAREWICZ, J. W.; SALINSKA, E.; WROBLEWSKI, J. T. NMDA receptor-mediated arachidonic acid release in neurons: role in signal transduction and pathological aspects. **Adv. Exp. Med. Biol.** 1992; 318:73-89.

LENZ, Q. F.; ARROYO, D. S.; TEMP, F. R.; POERSCH, A. B.; MASSON, C. J., JESSE, A. C.; MARAFIGA, JR.; RESCHKE, C. R.; IRIBARREN, P.; MELLO, C. F.; Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. **Neuroscience.** 2014; 1;277C:859-871.

LI, D.; BELUSA, R.; NOWICKI, S.; APERIA, A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na⁺,K⁺-ATPase are age dependent. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2000; 278(5):F823-9.

LI, J. C.; HAN, L.; WEN, Y. X.; YANG, Y. X.; LI, S.; LI, X. S.; ZHAO, C. J.; WANG, T. Y.; CHEN, H.; LIU, Y.; QI, C. L.; HE, X. D.; QU-LIANGGU, Y. E Y. X.; HUANG, R.; WU, Y. E.; SONG, X. Y.; CAO, L.; WANG, L. J. Increased Permeability of the Blood-Brain Barrier and Alzheimer's Disease-Like Alterations in Slit-2 Transgenic Mice. **J Alzheimers Dis.** 2014 (*in press*).

LINGREL, J.; MOSELEY, A.; DOSTANIC, I.; COUGNON, M.; HE, S.; JAMES, P.; WOO, A.; O'CONNOR, K.; NEUMANN, J. Functional roles of the alpha isoforms of the Na⁺K⁺-ATPase. **Ann NY Acad Sci.** 2003; 986:354-9.

LIPPOLDT, A.; KNIESEL, U.; LIEBNER, S.; KALBACHER, H.; KIRSCH T.; WOLBURG, H.; HALLER, H. Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. **Brain Res.** 2000; 8;885(2):251-61.

LÖSCHER, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **Eur J Pharmacol.** 2009; 21,610(1-3):1-11.

LUHESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. **The dynamics and mechanisms of interleukin-1alpha and beta nuclear import.** *Traffic.* 2009; 10(1):16-25.

MANEV, H. 5-Lipoxygenase gene polymorphism and onset of Alzheimer's disease. **Med Hypothesis.** 1998; 54, 75-76.

MARCHI, N.; FAN, Q.; GHOSH, C.; FAZIO, V.; BERTOLINI, F.; BETTO, G.; BATRA, A.; CARLTON, E.; NAJM, I.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. **Neurobiol Dis.** 2009;33(2):171-81.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; FRERI, E.; CIUSANI, E.; RAGONA, F.; PUVENNA, V.; TENG, Q; ALEXOPOLOUS, A.; JANIGRO, D. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. **PLoS One.** 2011; 28:6(3):18200.

MAROSO, M.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T.; LIU, J.; ARONICA, E.; IYER, A. M.; ROSSETTI, C.; MOLTENI, M.; CASALGRANDI, M.; MANFREDI, A. A.; BIANCHI, M. E.; VEZZANI, A. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nat Med.** 2010; 16(4):413-9.

MONTEIRO, A. P.; PINHEIRO, C. S.; GOMES, L. T.; ALVES, L. R.; MAYA, M. C. M.; PORTO, B. N.; FIDALGO, B. C.; BENJAMIM, C. F.; GOLDEN, P. M, BANDEIRA, M. C.; BOZZA, M. T.; CANETTI, C. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **J Immunol.** 2011;186(11):6562-7.

MOSELEY, A. E.; WILLIAMS, M. T.; SCHAEFER, T. L.; BOHANAN, C. S.; NEUMANN, J. C.; BEHBEHANI, M. M.; VORHEES, C. V.; LINGREL, J. B. Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci.** 2007; 27, 616-26.

OBY, E.; JANIGRO, D. The blood-brain barrier and epilepsy. **Epilepsia.** 2006; 47, 1761-1774.

OKADA, K.; YUHI, T.; TSUJI, S.; YAMASHITA, U. Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. **Brain Res.** 2001; 16:894(2):332-5.

OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; ROYES, L. F.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B.; OTALORA, L. F.; SANABRIA, G. E. R.; MELLO, C. F. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem.** 2009; 109, 416-426.

OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; ROYES, L. F.; FIGHERA, M. R.; FIORENZA, N. G.; CASTELLI, M.; MACHADO, P.; BOHRER, D.; VEIGA, M.; FERREIRA, J.; CAVALHEIRO, E. A.; MELLO, C. F. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res.** 2008; 79, 14-21.

OZKAN, E.; AKYÜZ, C.; SEHIRLI, A. O.; TOPALOĞLU, U.; ERCAN, F.; SENER, G. Montelukast, a selective cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, reduces cerulein-induced pancreatic injury. **Pancreas.** 2010; 39(7):1041-6.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S. H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G. D. Blood-brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. **J Neuroimmune Pharmacol.** 2006;1: 223–236.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. **Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders.** **Brain Res Rev.** 2006; 52, 201-243.

PIOMELLI, D.; ASTARITA, G.; RAPAKA, R. A neuroscientist's guide to lipidomics. **Nat Rev Neurosci.** 2007; 8, 743-754.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. **Models of Seizures and Epilepsy.** Ed. Elsevier, EUA. 2006.

REDZIC, Z. **Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences.** **Fluids Barriers CNS.** 2011; 8:3.

REHNI, A. K.; SINGH, T. G. **Modulation of leukotriene D4 attenuates the development of seizures in mice.** **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 2011; 85, 97-106.

REIME KINJO, E.; ARIDA, R. M.; OLIVEIRA, D. M.; DA SILVA, F. M. J. The Na⁺K⁺-ATPase activity is increased in the hippocampus after multiple status epilepticus induced by pilocarpine in developing rats. **Brain Res.** 2007; 23;1138:203-7.

RIAIZI, K.; GALIC, M. A.; PITTMAN, Q. J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. **Epilepsy Res.** 2010; 89(1):34-42.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; DAY, D. E.; NADEAU, B. A.; MCGUIRE, S. R.; HOESEL, L. M.; IPAHTCHI, K.; ZETOUNE, F. S.; SARMA, J. V.; LENG, L.; HUBER-LANG, M. S.; NEFF, T. A.; BUCALA, R.; WARD, P. A. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. **J Immunol.** 2008; 1;180(11):7664-72.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends Neurosci.** 2000; 23(12):618-25.

SALVADORI, M. G.; BANDERÓ, C. R.; JESSE, A. C.; GOMES, A. T.; RAMBO, L. M.; BUENO, L. M.; BORTOLUZZI, V. T.; OLIVEIRA, M. S.; MELLO, C. F. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. **Epilepsia.** 2011; 53(1):189-198.

SAMUELSSON, B. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. **Harvey Lect.** 1979; 75, 1-40.

SAYYAH, M.; JAVAD-POUR, M.; GHAZI-KHANSARI, M. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. **Neuroscience.** 2003; 122(4):1073-80.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nat Rev Neurosci.** 2006; 7(3):194-206.

SHAMRAJ, O. I.; MELVIN, D.; LINGREL, J. B. Expression of Na⁺K⁺-ATPase isoforms in human heart. **Biochem Biophys Res Commun.** 1991; 179:1434-1440.

SHI, L. L.; DONG, J.; NI, H.; GENG, J.; WU, T. Felbamate as an add-on therapy for refractory epilepsy. **Cochrane Database Syst Rev.** 2014; 18;7:8295.

SHORVON, S. The concept of symptomatic epilepsy and the complexities of assigning cause in epilepsy. **Epilepsy Behav.** 2014; 32:1-8.

SHORVON, S. The historical evolution of, and the paradigms shifts in the therapy of convulsive status epilepticus over the past 150 years. **Epilepsia.** 2013; 54; 6:64-7.

SIMMET, T.; TIPPLER, B. Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. **Brain Res.** 1990; 515, 79-86.

SINGH, T. U.; CHOUDHURY, S.; PARIDA, S.; MARUTI, B. S.; MISHRA, S. K. Arachidonic acid inhibits Na⁺,K⁺-ATPase via cytochrome P-450, lipoxygenase and protein kinase C-dependent pathways in sheep pulmonary artery. **Vascul Pharmacol.** 2012 ;56(1-2):84-90.

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

SINGH, R. K.; GUPTA, R.; DASTIDAR, S.; RAY, A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Molecular and Functional Characteristics. **Pharmacology.** 2010; 85:336–349.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na⁺,K⁺-ATPase. **J Bioenerg Biomembr.** 1992; 24:249- 61.

SLONIEWSKY, D. E.; RIDGE, K. M.; ADIR, Y.; FRIES, F. P.; BRIVA, A.; SZNAJDER, J. I.; SPORN, P. H. Leukotriene D4 activates alveolar epithelial Na,K-ATPase and increases alveolar fluid clearance. **Am J Respir Crit Care Med.** 2004; 169(3):407-12.

SMYTH, E. M.; BURKE, A.; FITZ GERALD, G. A. Autacoides Derivados de Lipídeos: eicosanoides e fator de ativação das plaquetas. In: BRUNTON, L. L. et al. (Eds.), Goodman e Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Mc-Graw Hill, Rio de Janeiro. 2006.

STAMATOVIC, S. M.; KEEP, R. F.; ANDJELKOVIC, A. V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. **Curr Neuropharmacol.** 2008; 6(3):179-92.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2000; 279(3):C541-66.

TOMKINS, O.; FRIEDMAN, O.; IVENS, S.; REIFFURTH, C.; MAJOR, S.; DREIER, J. P.; HEINEMANN, U.; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. **Neurobiol. Dis.** 2007; 25, 367–377.

TURRIN, N. P.; RIVEST, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. **Neurobiol. Dis.** 2004; 16, 321–334.

VAILLEND, C.; MASON, S. E.; CUTTLE, M. F.; ALGER, B. E. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase in the rat CA1 hippocampal region. **J Neurophysiol.** 2002 ;88(6):2963-78.

VAN GASSEN, K. L. DE W. M.; KOERKAMP, M. J.; RENSEN, M. G.; VAN RIJEN, P. C.; HOLSTEGE, F. C.; LINDHOUT, D.; DE GRAAN, P. N. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia.** 2008; 49: 1055-1065, 2008.

VAN VLIET, E. A.; DA COSTA, A. S.; REDEKER, S.; VAN SCHAIK, R.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. **Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy.** **Brain.** 2007; 130, 521-534.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 1998; 38:97-120.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomark Med.** 2011; 5(5):607-614.

VEZZANI, A.; PELTOLA, J.; JANIGRO, D. INFLAMMATION. In: ENGEL, J. R. J. AND PEDLEY, T. A. (Eds.), **Epilepsy A Comprehensive Textbook**, vol.1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2008.

VEZZANI, A. Inflammation and Epilepsy. **Epilepsy Curr,** 2005; 5(1).

VIOLETTE, M. I.; MADAN, P.; WATSON, A. J. Na⁺K⁺-ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. **Dev Biol.** 2006; 289(2):406–419.

WALKER, L.; SILLS, G. Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy? **Epilepsy Currents**. 2012; 12:1, 8–12.

WANG, L.; DU, C.; LV, J.; WEI, W.; CUI, Y.; XIE, X. Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 2011; 187, 2336-2345.

WANG, L.; HUANG, X. J.; FANG, S. H.; YUAN, Y. M.; ZHANG, W. P.; LU, Y. B.; DING, Q.; WEI, E. Q. Leukotriene D4 induces brain edema and enhances CysLT2 receptor- mediated aquaporin 4 expression. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006; 350, 399-404.

WANG, X.; CHUANG, H.; LI, J.; TAN, T. Regulation of PKC-θ function by phosphorylation in T cell receptor signaling. **Frontiers in Immunology**. 2012; 3(197), 1-8.

XIONG, Z. Q.; STRINGER, J. L. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. **J Neurophysiol.** 2000; 83(3):1443-51.

YANG, Y.; FRANKEL, W. N. Genetic approaches to studying mouse models of human seizure disorders. **Adv Exp Med Biol.** 2004; 548:1-11.

YU, X. M.; ASKALAN, R.; KEIL, G. J.; SALTER, M. W. NMDA channel regulation by channel associated protein tyrosine kinase. **Src. Science.** 1997; 275:674–678.

ZATTONI, M.; MURA, M. L.; DEPREZ, F.; SCHWENDENER, R. A.; ENGELHARDT B.; FREI, K.; FRITSCHY, J. M. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci.** 2011; 31(11):4037-50.

ZHAO, R.; SHI, W. Z.; ZHANG, Y. M.; FANG, S. H.; WEI, E. Q. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, attenuates chronic brain injury after focal cerebral ischaemia in mice and rats. **J Pharm Pharmacol.** 2011; 63, 550-557.

ZHOU, C.; SHI, X.; HUANG, H.; ZHU, Y.; WU, Y. Montelukast attenuates neuropathic pain through inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B in a rat model of chronic constriction injury. **Anesth Analg.** 2014; 118(5):1090-6.

ZHU, L.; MARUVADA, R.; SAPIRSTEIN, A.; MALIK, K. U.; PETERS, G. M.; KIM, K. S. Arachidonic acid metabolism regulates Escherichia coli penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun.** 2010; 78: 4302-4310.

ZLOKOVIC, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron.** 2008; 24;57(2):178-201.