

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

**PAPEL DA Na⁺, K⁺ - ATPASE NO MODELO DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL EM
CAMUNDONGOS**

TESE DE DOUTORADO

Vinícius Rafael Funck

**Santa Maria, RS, Brasil,
2015**

**PAPEL DA Na⁺, K⁺ - ATPASE NO MODELO DE EPILEPSIA
DO LOBO TEMPORAL EM CAMUNDONGOS**

Vinícius Rafael Funck

Tese apresentada no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

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

Funck, Vinicius Rafael
PAPEL DA Na⁺, K⁺ - ATPASE NO MODELO DE EPILEPSIA DO
LOBO TEMPORAL EM CAMUNDONGOS / Vinicius Rafael Funck.-
2015.
92 p. ; 30cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2015

1. Epilepsia I. Oliveira, Mauro Schneider II. Título.

**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

**PAPEL DA Na⁺, K⁺ - ATPASE NO MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL EM CAMUNDONGOS**

elaborada por
Vinícius Rafael Funck

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (Orientador)

Cristiano Ricardo Jesse, Dr. (UNIPAMPA)

Marilise Escobar Burger, Dr^a. (UFSM)

Jamile Fabbrin Gonçalves, Dr^a. (IFFarroupilha)

Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 16 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus.

Aos meus pais, Elaine e Ademir e ao meu irmão Vagner pelo apoio em todos os sentidos, para que eu concluísse meus estudos, abdicando de muitas coisas ao longo do tempo para que eu não desistisse dos meus objetivos. Esse trabalho é dedicado para vocês, terei eterna gratidão por tudo o que me oportunizaram.

Em especial, agradeço a minha namorada Elisa, que conheci durante o meu doutorado e em razão da similaridade das nossas áreas de estudo. Obrigado por sempre me apoiar nas horas boas e difíceis ao longo desse período. Foi muito presente na minha vida, mesmo estando distante fisicamente, me deu todo o apoio para que eu alcançasse meus objetivos e concluísse o doutorado com a perspectiva de uma nova vida com novos objetivos. Espero um dia poder retribuir todo o amor, carinho e dedicação que recebi de você, te amo muito. Agradeço também aos pais dela, Roberto e Fátima, por todo o apoio e suporte pelas inúmeras vezes que estive na casa deles para fazer as provas e concursos, tenho muita gratidão por tudo que fizeram por nós.

Ao meu orientador e amigo Mauro, por tudo que aprendi com ele, por toda a paciência em passar seu conhecimento, além do esforço e preocupação em nos ajudar, mesmo com os poucos recursos disponíveis, sempre procurava um jeito de melhorar nosso trabalho. Obrigado pela disponibilidade de me orientar desde o meu mestrado.

Quero agradecer as pessoas que me acolheram e ajudaram no período de estágio nos Estados Unidos, o Professor Emilio Rafael Garrido-Sanabria pela oportunidade de desenvolver meus conhecimentos no seu laboratório, ao Pacheco meu mentor no laboratório e parceiro para todas as horas, Leandro e Karen pela

amizade me ajudando na adaptação ao novo país, além de todos que trabalhavam no laboratório, alunos, professores e funcionários da UTB, Dr. Colom, que sempre foram muito educados e atenciosos.

Obrigado a todos nosso laboratório, orientados da Ana e do Mauro, o nosso pós-doc Samurai, sempre parceiros e ajudando nos experimentos, sem vocês não teria como desenvolver esse trabalho.

Ao professor Carlos Mello e seus orientados, por todo o suporte, e a disponibilidade de usar o seu laboratório discutir sobre os resultados, métodos e estatísticas, e também pela parceria nos trabalhos.

A toda gurizada do BIOEX e o professor Luiz Fernando que nós ajudaram durante todo o período do trabalho e pelo livre acesso ao laboratório no CEFD.

A galera de UPT e meus colegas e amigos da graduação que manterão contato Cássia, Fernanda e o André.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de subir mais um degrau na vida acadêmica. Também agradeço todos os professores e funcionários do departamento.

E, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPERGS e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

PAPEL DA Na⁺, K⁺ - ATPASE NO MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL EM CAMUNDONGOS

Autor: Vinícius Rafael Funck
Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Data e Local da defesa: Santa Maria, 16 de Março de 2015.

A epilepsia é uma doença que atinge cerca de 1 % da população em geral. Embora vários tratamentos farmacológicos sejam utilizados, um elevado número de pacientes com epilepsia são refratários às drogas disponíveis atualmente o que torna importante à busca por novas drogas anticonvulsivantes. Para isso, é necessário um modelo que reproduza a epilepsia, como é o caso do modelo da pilocarpina, um agonista muscarínico que causa convulsões límbicas e status epilepticus (SE), que após crises recorrentes se caracteriza por uma epilepsia do lobo temporal. Um possível alvo farmacológico na terapia da epilepsia é a enzima Na⁺, K⁺-ATPase, que se caracteriza por ser uma proteína de membrana plasmática que tem um papel importante na manutenção da homeostase iônica celular cuja mudança na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase afeta diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal. Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da Na⁺, K⁺-ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado. Portanto, o presente estudo, procurou o papel da Na⁺, K⁺-ATPase e de um anticorpo específico que aumenta a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase (DRRSAb), no modelo da pilocarpina em camundongos C57BL/6 e sobre a susceptibilidade ao pentilenotetrazol (PTZ). Foi constatado que a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase está diminuída no hipocampo de camundongos 60 dias após o SE. Além disso, a constante de Michelis-Menten para as diferentes concentrações de ATP aumentou no grupo pós-SE. A redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase parece envolver a nitração da subunidade α , mas nenhuma alteração na expressão ou no estado de fosforilação na Ser943 foi encontrada. Interessantemente, a ativação da Na⁺, K⁺-ATPase, com uma injeção intrahipocampal do anticorpo DRRSAb produzido contra um local regulador da subunidade α , diminui a susceptibilidade para crises mioclônicas induzida por PTZ nos animais epiléticos. Por outro lado, a administração de DRRSAb no hipocampo de animais normais facilitou o aparecimento de convulsões induzidas por PTZ. A análise quantitativa do registro eletroencefalográfico (EEG) no hipocampo, revelou que o DRRSAb aumentou a porcentagem de poder total na frequência da banda delta (0-3 Hz), quando analisado padrão de atividade irregular de grande amplitude (LIA). Por outro lado, não houve alterações induzidas pelo DRRSAb sobre o estado funcional do ritmo teta. Portanto, a ativação Na⁺, K⁺-ATPase, como uma nova abordagem em distúrbios convulsivos, pode tornar-se um alvo farmacológico em potencial na epilepsia.

Palavras chaves: Epilepsia do lobo temporal; Na⁺, K⁺-ATPase; Pilocarpina.

ABSTRACT

Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

ROLE OF Na⁺ K⁺ - ATPASE IN A MODEL TEMPORAL LOBE EPILEPSY IN MICE

Author: Vinícius Rafael Funck
Mentor: Mauro Schneider Oliveira
Place and date: Santa Maria, March, 16th, 2015.

Epilepsy is a disease that affects about 1-2% of the general population. Considering the high number of patients with epilepsy who are refractory to currently available drugs, it is important to search for new anticonvulsant drugs. For this it is important that reproduces model epilepsy, such as the pilocarpine model, a muscarinic agonist causing limbic seizures and status epilepticus, which after a latency period is characterized by a temporal lobe epilepsy. A potential drug target in the treatment of epilepsy is the Na⁺,K⁺-ATPase, which is characterized by being a plasma membrane protein having important role in the maintenance of cellular ionic homeostasis, changes in the Na⁺,K⁺-ATPase activity directly affect cell signaling via neurotransmitters and neuronal activity. In this context, a impair the functioning of the Na⁺,K⁺-ATPase leads to an increased or decreased neuronal excitability, depending on the degree of inhibition induced neuronal and type affected. Therefore, the present study searched for the role of Na⁺,K⁺-ATPase and the specific antibody that enhances the activity of Na⁺,K⁺-ATPase (DRRSAb) in the pilocarpine model in C57BL/6 mice challenged with pentylenetetrazol (PTZ). It was seen that the activity of Na⁺,K⁺-ATPase was decreased in hippocampus of epileptic mice, 60 days after status epilepticus (SE). Furthermore, the Michelis-Menten constant for different ATP concentrations increased in the SE. Reduced activity of Na⁺,K⁺-ATPase appears to involve the nitration of α subunit, but no changes in the expression or its phosphorylation state at Ser943 was found. Interestingly, activation of Na⁺,K⁺-ATPase intrahippocampal injection with a specific antibody (DRRSAb) produced against a regulatory site of the α subunit, decreases susceptibility to myoclonic seizures induced by PTZ in epileptic animals. On the other hand, the administration of DRRSAb in the hippocampus of naive animals facilitated the onset of seizures induced by PTZ. Quantitative analysis of hippocampal EEG recordings revealed that DRRSAb increased the percentage of total power contributed by delta frequency band (0-3 Hz) to large irregular amplitude pattern of hippocampal EEG. On the other hand, no DRRSAb-induced changes were found regarding the theta functional state. Therefore, activation of Na⁺,K⁺-ATPase activity as a novel approach in seizure disorders, may become a potential target for epilepsy.

Key words: Temporal lobe epilepsy; Na⁺,K⁺-ATPase; Pilocarpine.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT	3-nitrotirosina
ATP	Adenosina trifosfato
DRRSAb	Anticorpo específico que aumenta a atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
EEG	Eletroencefalografia
GABA_A	Receptor do ácido γ-aminobutírico
HNE	4-Hidroxineonal (produto da peroxidação lipídica)
IC₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
K⁺	Íon Potássio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LIA	Atividade irregular de grande amplitude
MES	Convulsão por eletrochoque máximo
Na⁺	Íon sódio
NMDA	N-metil D-Aspartato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	Status epilepticus
SSA412	Anticorpo específico que aumenta a atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
α	Subunidade Alfa
β	Subunidade Beta
γ	Subunidade Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
2.3. Justificativa.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Epilepsia: Aspectos Gerais.....	14
3.1.1. Epidemiologia.....	15
3.1.2. Classificação.....	16
3.1.3. Diagnóstico e tratamento da epilepsia.....	18
3.1.2 Modelos Experimentais em Epilepsia.....	19
3.2. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	23
3.3. Ativador da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	28
4. ARTIGO.....	30
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Methods.....	32
Results.....	32
Discussion.....	33
References.....	35
5. MANUSCRITO.....	44
Abstract.....	45
Introduction.....	47
Experimental procedures.....	48
Results.....	53
Discussion.....	55
References.....	61
6. RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	71
7. DISCUSSÃO.....	75
8. CONCLUSÃO.....	79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica não transmissível que afeta pessoas de todas as idades (Fisher, Acevedo et al. 2014). Cerca de 65 milhões de pessoas têm epilepsia. Quase 80% das pessoas com epilepsia são encontradas nos países em desenvolvimento e em torno de três quartos das pessoas afetadas nesses países não recebem o tratamento necessário. Mas 70% dos pacientes medicados respondem ao tratamento ao longo tempo. A principal e mais marcante característica da epilepsia é a ocorrência de crises epiléticas, definidas como alterações comportamentais e/ou motoras resultantes de descargas paroxísticas excessivas e sincrônicas de grupos de neurônios no encéfalo. Essas crises acarretam enorme prejuízo à qualidade de vida dos pacientes afetados pela doença, bem como seus familiares, que em muitos lugares do mundo sofrem com discriminação perante a sociedade que vivem (WHO, 2006; Fisher, Acevedo et al. 2014).

O Ministério da Saúde do Brasil, na Portaria 1.161, de sete de Julho de 2005, reconhece a importância epidemiológica e a magnitude social das doenças neurológicas no Brasil, incluindo a epilepsia, bem como o custo elevado e crescente para o país, ressaltando e enfatizando o quadro de morbidade com alto grau de sequelas das doenças neurológicas e a elevada taxa de mortalidade (Brasil, 2005).

O tipo mais comum (seis em cada dez pessoas com a doença) é a epilepsia idiopática, que não tem causa identificável. Em muitos destes casos existe uma alteração genética subjacente. A epilepsia com uma causa conhecida é chamada epilepsia secundária, ou epilepsia sintomática. As causas de epilepsia secundária podem ser: danos cerebrais a partir de lesões pré-natais ou perinatais (a perda de oxigênio ou trauma durante o parto, baixo peso ao nascer), anomalias congênitas ou doenças genéticas com malformações cerebrais, trauma cranioencefálico, acidente vascular cerebral, infecção do cérebro, tais como a meningite, a encefalite, a neurocisticercose e tumor cerebral (WHO, 2012).

Além das crises epiléticas, a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia é afetada negativamente por diversas comorbidades neurológicas de difícil tratamento, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e déficit cognitivo

(Hermann, Seidenberg et al. 2008). Contudo, a origem dessas comorbidades têm sido historicamente atribuídas, por exemplo, à consciência do paciente de sua condição crônica, à presença de neuropatologia primária (por exemplo, esclerose do lobo temporal) ou mesmo consideradas efeitos adversos indissociáveis dos fármacos anticonvulsivantes. Diversos estudos recentes têm mostrado que, alterações neuroquímicas e estruturais podem contribuir de maneira crucial para o aparecimento de transtornos de humor, ansiedade e problemas cognitivos (Hermann, Seidenberg et al. 2008).

Embora uma miríade de alterações moleculares e celulares ocorra durante a epileptogênese e a epilepsia, os mecanismos exatos que levam ao aparecimento de crises epiléticas espontâneas permanecem desconhecidos. Assim, o entendimento das bases moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da epilepsia, é de fundamental importância para a concepção de estratégias terapêuticas eficazes para prevenção da epilepsia ou modificação da doença. Atualmente, tais estratégias inexistem ou são falhas, pois não existem agentes verdadeiramente antiepileptogênicos, que por consequência, as crises epiléticas permanecem refratárias aos fármacos disponíveis em um número significativo de pacientes (30-40 %) (Ben-Menachem, Chadwick et al., 2007).

Um dos possíveis candidatos a alvo farmacológico, na terapia da epilepsia, é a enzima Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3.6.3.9). A Na^+ , K^+ -ATPase é uma proteína de membrana plasmática que está presente nas células eucarióticas e possui um papel crucial na manutenção da homeostase iônica celular (Skou and Esmann, 1992) Por isso, alterações na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase afetam diretamente a sinalização celular e a atividade neuronal, bem como, o comportamento quando analisada em experimentação animal (Moseley et al., 2007). A reação catalisada pela Na^+ , K^+ -ATPase é o transporte de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular, usando energia proveniente do ATP (Skou and Esmann 1992). Ao regular o gradiente de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática, a Na^+ , K^+ -ATPase regula, de maneira indireta, a concentração intracelular de outros íons, como Ca^{2+} , Cl^- e H^+ , e de diversas substâncias como água e glicose (Skou and Esmann 1992).

Ao lado dos sítios de fosforilação da Na^+ , K^+ -ATPase, recentemente foi identificado um sítio de ativação da enzima, que reside entre os aminoácidos 897 a 911 da região extracelular e entre os domínios H7-H8 da subunidade α da Na^+ , K^+ -

ATPase (Xu 2005; Xu, Takimoto et al. 2006; Lee, Klein et al. 2009). De modo importante, foi demonstrado que um anticorpo direcionado contra tal região da enzima foi capaz de ativar a Na^+ , K^+ -ATPase em cardiomiócitos, aumentando sua atividade em duas a três vezes (Xu 2005). Nesse contexto, o anticorpo DRRSAb constitui uma ferramenta farmacológica capaz de aumentar de modo direto e específico a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase. Considerando que a literatura ainda é limitada em informações a respeito das consequências funcionais e comportamentais da modulação da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na epilepsia. O uso desse anticorpo que modula a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, poderia ser uma ferramenta farmacológica para o estudo de doenças neurológicas como a epilepsia do lobo temporal.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICAVA

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da Na^+ , K^+ -ATPase no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em camundongos C57BL/6, bem como, o efeito DRRSAb sobre a susceptibilidade para as crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ).

2.2 Objetivos específicos

Determinar se os animais no período de 1, 7 e 60 dias após *status epilepticus*, altera a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo da bem como a respectiva imunoreatividade para forma total e fosforilada na Ser943.

Avaliar se animais 60 dias após o *status epilepticus* altera a cinética enzimática da Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo.

Investigar se as alterações na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase estão associadas aos marcadores de dano oxidativo como 3-nitrotirosina (3-NT), 4-hidroxineonal (HNE) e carbonilação proteica.

Verificar o efeito do anticorpo DRRSAb em camundongos não epiléticos e epiléticos na susceptibilidade para as crises induzidas por PTZ.

Avaliar o efeito do anticorpo DRRSAb sobre os ritmos teta e na atividade irregular de amplitude grande (LIA) no EEG dos animais não epiléticos.

2.3. Justificativa

Considerando que a epilepsia do lobo temporal não é controlada em cerca de 20-30 % dos casos com os fármacos existentes na clínica, torna-se importante a busca por novos alvos terapêuticos e drogas anticonvulsivantes. Tem-se a Na^+, K^+ -ATPase como um alvo em potencial, pela sua importância na homeostase cerebral e controle da excitabilidade, considerando ainda que existe um anticorpo que modula sua atividade, justificando o desenvolvimento do presente estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epilepsia: aspectos gerais

Epilepsia (Epilambanein - verbo grego antigo que significa "apreender, possuir, ou afligir") (Magiorkinis, Sidiropoulou et al. 2010) é um grupo de doenças neurológicas crônicas caracterizadas por crises epiléticas (Chang and Lowenstein 2003). Essas crises são episódios que podem variar de breve e quase indetectável, a longos períodos de agitação vigorosa. Na epilepsia, crises tendem a ocorrer, mesmo não tendo nenhuma causa subjacente imediata, enquanto as crises que ocorrem devido a uma causa específica são consideradas representativas para epilepsia (Fisher, van Emde Boas et al. 2005; Fisher, Acevedo et al. 2014).

Antigos registros médicos mostram que a epilepsia vem afetando as pessoas desde o início da existência humana. Ao longo da história antiga, o transtorno foi considerado uma condição espiritual. A descrição mais antiga que se sabe é de uma crise epilética que aparece em um texto em acadiano (a língua usada na antiga Mesopotâmia) e foi escrito por volta de 2000 a.C.. A pessoa descrita no texto foi diagnosticada por estar sob a influência de um Deus da lua, e foi submetida a um exorcismo. As crises epiléticas são listadas no Código de Hamurabi (1790 a.C.) e Edwin Smith Papiro (1700 a.C.) descrevendo casos de indivíduos com crises epiléticas (Magiorkinis, Sidiropoulou et al. 2010). Posteriormente, Hipócrates propôs que a hereditariedade era uma importante causa da doença, sendo que os piores resultados da doença se apresentavam em uma idade avançada, e fez nota das características físicas, bem como a vergonha social associada às crises. Em vez de se referir a ela como a doença sagrada, ele usou o termo grande doença, dando origem ao termo moderno grande mal, utilizado para crises generalizadas. Apesar de seu trabalho detalhando as origens físicas da doença, seu ponto de vista não foi aceito na época, e continuaram responsabilizando os maus espíritos, pelo menos até o século 17 (Saraceno and Saxena 2005). Somente no século 19, foi utilizado o Brometo como o primeiro medicamento anticonvulsivante que obteve alguma eficácia. O primeiro tratamento da era moderna foi com Fenobarbital, desenvolvido em 1912 e com a Fenitoína entrando em uso em 1938 (Perucca and Gilliam 2012).

3.1.1 Epidemiologia

Cerca de 1% da população mundial (aproximadamente 65 milhões de pessoas) tem epilepsia, sendo que 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (Brodie, Elder et al. 2009; Thurman, Beghi et al. 2011). Nos países desenvolvidos o início dos novos casos ocorre com maior frequência em crianças e idosos, nos países em desenvolvimento a frequência é maior em crianças mais velhas e adultos jovens, geralmente relacionado aos altos índices de trauma e doenças infecciosas (Newton and Garcia 2012) e também devido às diferenças na frequência das causas subjacentes que levam as crises.

A prevalência de epilepsia ativa é de 5-8 por 1000 habitantes em países de alta renda e 10 por 1000 habitantes em países de baixa renda, onde as taxas ainda mais elevadas foram relatados em áreas rurais. Estas diferenças regionais, provavelmente, resultam de diferenças nos fatores de risco para a epilepsia, incluindo infecções e cuidados pré-natais e perinatais inadequada. Existem diferenças equivalentes para a incidência de epilepsia: resultados de uma meta-análise de 2011 mostrou que a incidência anual é de 45 por 100.000 da população nos países de alta renda e 82 por 100.000 população de baixa renda e de renda média países (Moshe, Perucca et al. 2014). A pobreza é um fator de risco para a epilepsia, isso inclui tanto ser de um país pobre e também ser pobre em relação aos outros dentro de seu país. Altas taxas da doença em países em desenvolvimento estão na sua maioria relacionadas a parasitoses (neurocisticercose), infecções intracranianas virais ou bacterianas, tocotraumatismo, traumatismo crânio-encefálico e doenças cerebrovasculares (Carpio and Hauser 2009). Nos países desenvolvidos, diminuiu o número de casos em crianças e aumentou entre os idosos, considerando os casos pesquisados entre 1970 e 2003 (Sander 2003). Isto tem sido atribuído, em parte, a uma melhor sobrevivência após acidentes vasculares cerebrais em idosos (Neligan, Hauser et al. 2012).

Um estudo epidemiológico realizado em hospitais psiquiátricos mostra que o diagnóstico de epilepsia aparece em torno de 10% dos pacientes internados

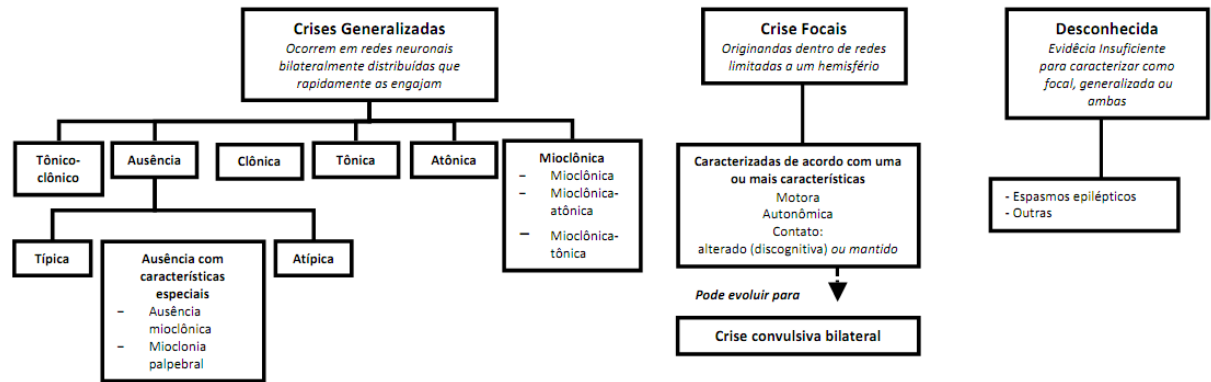
(Kummer, Nunes et al. 2005). No Brasil algo entre 530 e 890 mil pessoas tem epilepsia e algum transtorno mental associado (Marchetti 2004). Cerca de 5 a 10% de todas as pessoas poderão ter uma crise não provocada até os 80 anos (Wilden and Cohen-Gadol 2012), onde a chance de ocorrer uma segunda crise está entre 40 e 50% (Berg 2008). As pessoas com epilepsia têm uma série de restrições para manter uma vida normal, uma delas é a restrição de conduzir veículos motorizados, mas a maioria é capaz de voltar a dirigir depois de um período de tempo sem crises (Devlin, Odell et al. 2012).

3.1.2 Classificação

A epilepsia pode ser classificada a partir dos tipos de crise, baseada na sua descrição clínica e nos achados eletroencefalográficos. São divididas basicamente em crises focais ou crises generalizadas. Crises epiléticas generalizadas são conceituadas como originárias em algum ponto dentro de redes distribuídas bilateralmente. Essas redes bilaterais podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente o córtex inteiro. Embora o início de crises individuais possa parecer localizado, a localização e lateralização, não são consistentes de uma crise à outra. Crises generalizadas podem ser assimétricas (Berg, Berkovic et al. 2010).

Crises epiléticas focais são conceituadas como originárias dentro das redes limitadas a um hemisfério. As crises focais podem ser originárias de estruturas subcorticais. Para cada tipo de crise, o início ictal é consistente a partir de uma crise para outra, com padrões de propagação preferencial que podem envolver o hemisfério contralateral. Em alguns casos, no entanto, há mais de uma rede, e mais de um tipo de crise, mas cada tipo de crise individual tem um local consistente de início. A distinção entre os diferentes tipos (por exemplo, parciais complexas e parciais simples) foi eliminada. É importante, no entanto, reconhecer que prejuízo da consciência/percepção ou outras características cognitivas, como localização e progressão dos acontecimentos ictais, podem ser de primordial importância na avaliação individual de pacientes e para fins específicos (por exemplo, diagnóstico diferencial de eventos não epiléticos de crises epiléticas, ensaios randomizados,

cirurgia). Nada na presente recomendação impede descrever as crises focais de acordo com estas ou outras características (Berg, Berkovic et al. 2010). As classificações das crises estão bem descritas na figura 1.



Modificações maiores na terminologia e conceitos	
Novos Termos e Conceitos	Termos e Conceitos Antigos
Etiologia	Exemplos
Genética: defeito genético que pode contribuir diretamente para a epilepsia e crises como sintoma principal do distúrbio. Ex: canalopatias, deficiência GLUT1	Idiopática: presumivelmente genética
Estrutural/metabólica: causada por distúrbio estrutural/metabólico cerebral. Ex: esclerose tuberosa	Sintomática: secundária a um distúrbio conhecido ou presumido do cérebro
Desconhecido: a causa é desconhecida e pode ser genética, estrutural ou metabólica	Criptogênica: presumivelmente sintomática
Terminologia	Termos não mais recomendados
Auto-Limitada: tendência a resolver espontaneamente com o tempo	Benigna, catastrófica
Farmacoresponsiva: altamente provável de ser controlada com medicamentos	
Crises Focais: semiologia das crises descrita de acordo com características específicas subjetivas (aura), motora, autonômica ou discognitiva	Parcial Complexa Parcial Simples
Evoluindo para crise convulsiva bilateral: ex: tônica, clônica, tônico-clônica	Secundariamente generalizada

Figura 1 – Classificação das crises e modificações na terminologia e conceitos (Diagrama resumo da Revisão terminológica para organização de crises e epilepsias da ILAE de 2010 divulgado durante o 29º Congresso da ILAE/IBE em Agosto de 2011.)

Do ponto de vista etiológico, a epilepsia pode ser dividida em três grandes categorias (Berg and Scheffer 2011): a epilepsia genética, em que um defeito genético contribui diretamente para a epilepsia e para as crises como sintoma principal do distúrbio (por exemplo, canalopatias); a epilepsia estrutural/metabólica, causada por distúrbio estrutural e/ou metabólico cerebral (por exemplo, malformação cerebral, infecção, tumor, acidente vascular encefálico ou estado de mal epilético - *status epilepticus*) e a epilepsia com etiologia desconhecida, quando não há evidência clara de um fator etiológico.

3.1.3 Diagnóstico e tratamento da epilepsia

O diagnóstico de epilepsia é normalmente feito com base na descrição da crise pelo paciente ou testemunha e também da causa subjacente. Um eletroencefalograma (EEG) e uma neuroimagem, também são geralmente parte da bateria de exames. Contudo, nem sempre é possível descobrir qual é a síndrome epiléptica específica. O monitoramento por vídeo EEG pode ser útil em casos difíceis de diagnosticar (Moshe, Perucca et al. 2014).

No geral, cerca de 70% dos pacientes conseguem ficar livre das crises com o tratamento médico utilizado de forma adequada, com taxas de resposta variando em relação ao tipo de síndrome epiléptica, causa subjacente e outros fatores. Independentemente de fatores prognósticos, a maioria dos pacientes respondem sem crises à droga prescrita inicialmente (Moshe, Perucca et al. 2014). Os mais de 30% dos pacientes que não respondem bem ao tratamento inicial são mais propensos a continuar tendo crises. Deste modo, a politerapia com fármacos antiepiléticos e ou a cirurgia podem ser consideradas como a solução. Ao combinar fármacos antiepiléticos, muitos fatores importantes devem ser considerados, incluindo eficácia, efeitos adversos, espectro de ação, interações medicamentosas, farmacocinéticas de cada fármaco (Lee 2014).

Não existe um único medicamento antiepilético ideal para o tratamento de primeira linha em todos os pacientes. Conforme recomendado pelas diretrizes do Instituto Nacional do Reino Unido para Cuidados e Saúde, deve ser considerado o tipo de crise, síndrome, e outras características, tais como idade, sexo, e comorbidades (Moshe, Perucca et al. 2014).

São eficazes contra crises focais e tipos de crises mais generalizadas: O ácido valpróico e benzodiazepínicos (ocasionalmente podem agravar crises tônicas, particularmente após o uso intravenoso em pacientes com síndrome de Lennox-Gastaut). Fenobarbital e primidona não são eficazes contra as crises de ausência. Lamotrigina pode agravar crises mioclônicas em alguns pacientes. Já a lamotrigina, topiramato, zonisamida, rufinamida e felbamato agem contra crises focais e, secundariamente, crises generalizadas tônico-clônicas, principalmente, síndrome

Lennox-Gastaut. Levetiracetam é eficaz contra crises focais, generalizadas tônico-clônicas e, principalmente, crises mioclônicas (Moshe, Perucca et al. 2014).

Já a carbamazepina, fenitoína, oxcarbazepina, o acetato de eslicarbazepina, tiagabina são eficazes contra crises focais, com ou sem generalização secundária. A lacosamida, retigabina e perampanel não foram avaliados em pacientes com crises generalizadas. Porém, a gabapentina e a pregabalina podem precipitar ou agravar crises mioclônicas, bem como a vigabatrina, mas esta é eficaz contra espasmos infantis. Etossuximida é eficaz contra crises de ausência, mas também pode ser eficaz contra crises mioclônicas (Moshe, Perucca et al. 2014).

3.1.4 Modelos experimentais em epilepsia

Para a melhor compreensão dos mecanismos e processos fisiopatológicos dos diferentes tipos de crises são necessários modelos experimentais fidedignos, para que possam reproduzir de forma similar as manifestações que aparecem em humanos. Além disso, esses modelos são de grande importância para a identificação de novas drogas que tenham um valor preditivo antiepiléptico.

Um esquema simples de classificação dos modelos animais experimentais de crises epiléticas e epilepsia é mostrado na figura 2. Para a descoberta de novas drogas antiepilépticas, é necessária a triagem de um grande número de compostos, onde os modelos animais devem ser de fácil execução, eficientes e preditivos com o que se tem na clínica. Os dois modelos mais simples de convulsão em camundongos e ratos, são o modelo de crises epiléticas por eletrochoque máximo (MES) e o pentilenotetrazol (PTZ), que foram desenvolvidos há mais de 60 anos, (Bialer and White 2010), e a pilocarpina que é um modelo experimental de epilepsia do lobo temporal é utilizado desde os anos 80 (Turski, Cavalheiro et al. 1987), ainda são os modelos animais mais utilizados na busca de novas drogas anticonvulsivantes.

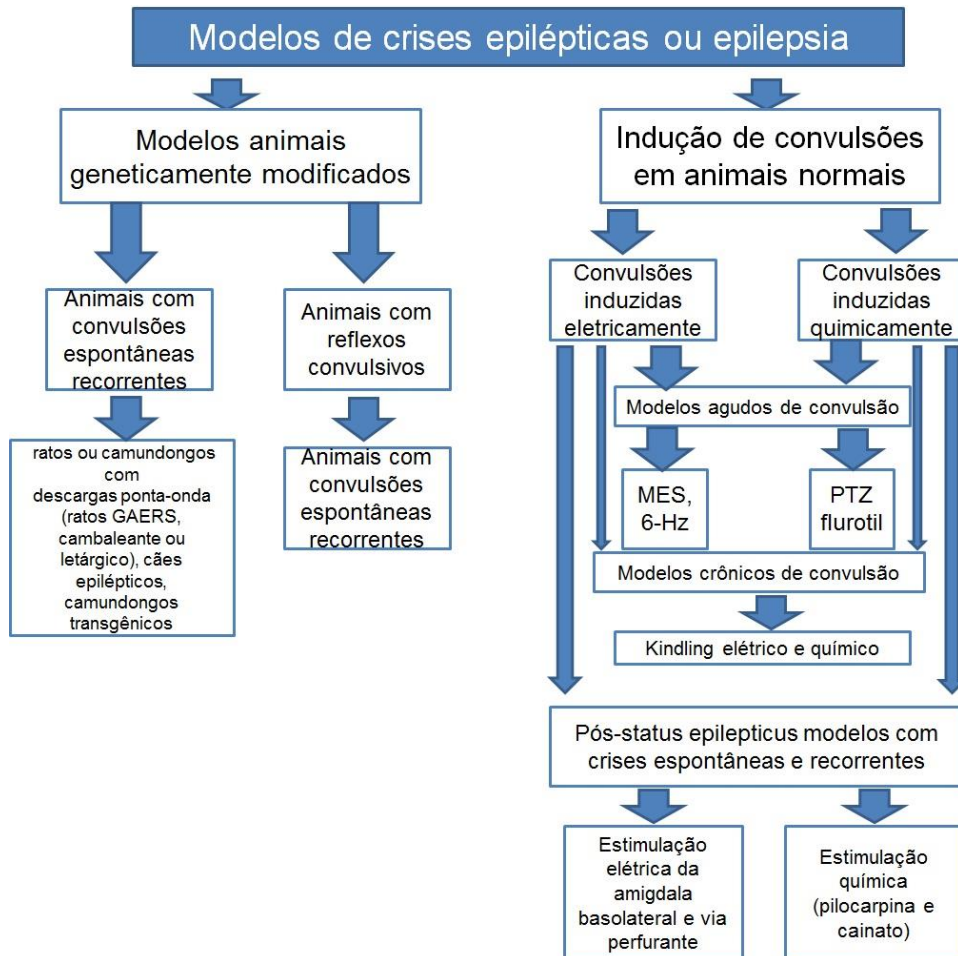


Figura 2: Uma visão geral dos modelos de crises epilépticas ou de epilepsia adaptado de (Loscher 2011).

O PTZ é um antagonista do receptor $GABA_A$, que age através de uma provável interação alostérica no canal de Cl^- (Figura 3). As crises induzidas pelo PTZ via bloqueio do receptor são similares as crises induzidas pela picrotoxina. No entanto, os domínios de interação do receptor com o PTZ são diferentes dos domínios que interagem com a picrotoxina (Huang, Bell-Horner et al. 2001). O antagonismo do receptor $GABA_A$, inibindo as correntes de cloreto causadas pelo PTZ, potencializa a neurotransmissão excitatória e desencadeia as convulsões, por isso é considerado um bom modelo para convulsão generalizada (Kupferberg 2001). Além disso, através de estratégias farmacológicas utilizando doses menores, ou uma dose subconvulsivante (30 mg/kg) de PTZ é possível avaliar a susceptibilidade as crises, pois é uma dose que por si só não causa crises generalizadas, somente podendo causar crise de ausência e mioclonias, tendo assim um espectro amplo

para piora em caso de susceptibilidade, também é usada essa dose para induzir *kindling* por PTZ (Blanco, dos Santos et al. 2009; Kuznetzova, Karpova et al. 2014; Hill-Yardin, Argyropoulos et al. 2015).

Nesse sentido, é de especial interesse mencionar que a modulação das convulsões induzidas por PTZ pode ser particularmente relevante para o desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes, visto que a supressão das alterações eletroencefalográficas induzidas por PTZ possui alto valor preditivo para drogas clinicamente efetivas contra crises generalizadas do tipo tônico-clônicas e crises de ausência (Dichter 2007).

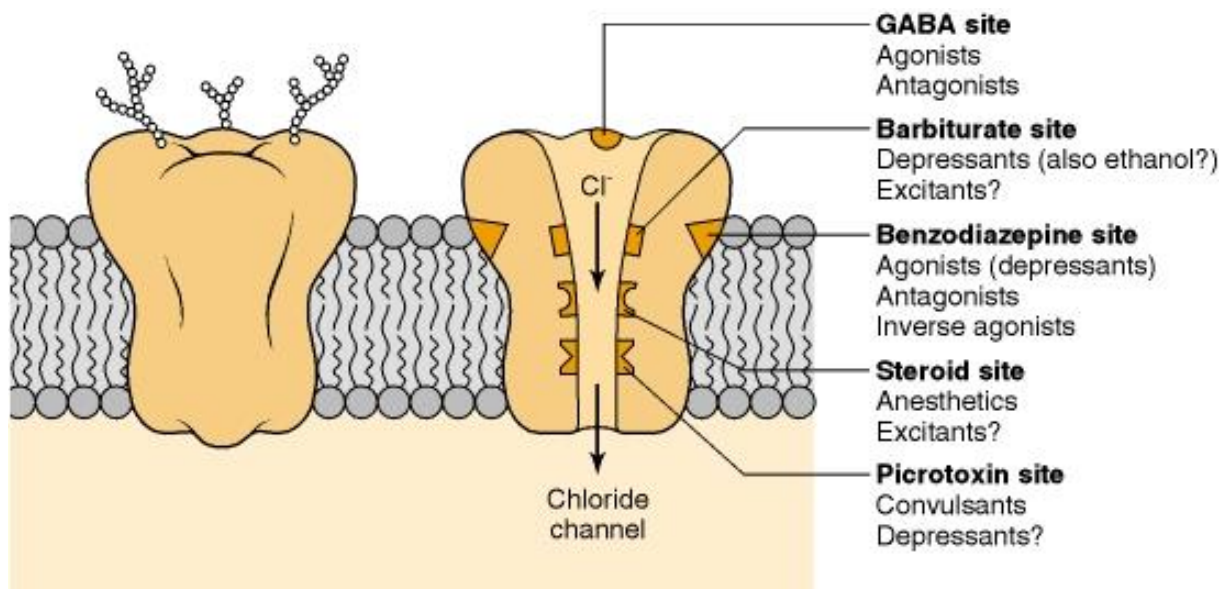


Figura 3: Representação do receptor GABA_A mostrando os respectivos sítios de ligação de alguns receptores.

O modelo de epilepsia induzido pela administração sistêmica de pilocarpina reproduz em roedores muitas das características da epilepsia do lobo temporal em humanos, incluindo a presença de um período silencioso que precede o aparecimento das convulsões espontâneas, esclerose e reorganização da circuitaria hipocampal e farmacoresistência (Cavalheiro 1995; Scorza, Arida et al. 2009; Oliveira, Pacheco et al. 2011).

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas do jaborandi, uma planta conhecida há tempos pelos índios tupi-guarani, que habitavam o Brasil e tiravam proveito de suas propriedades de produzir suor. Foi introduzida na prática clínica pelo médico brasileiro Sinfrônio Coutinho, em 1874, através de extratos da folha do jaborandi para obter efeito diaforético (produção de suor) e sialogogo (produção de saliva). A pilocarpina é usada como agente miótico (provoca a contração da pupila) e no tratamento do glaucoma, sendo empregada na forma de colírio (Holmstedt, Wassen et al. 1979). Trata-se de um agonista do receptor muscarínico, cuja administração sistêmica aguda de pilocarpina em roedores leva a um padrão de repetitivas convulsões límbicas e ao *status epilepticus* (SE), seguido por um período de latência (período silencioso) que precede o desenvolvimento das crises convulsivas espontâneas e recorrentes, que duram por toda vida do animal (período crônico) (Clifford, Olney et al. 1987; Muller, Bankstahl et al. 2009). O modelo se caracteriza por uma proeminente epilepsia do lobo temporal com alterações cognitivas, comportamentais e dano hipocampal, semelhante à esclerose hipocampal na epilepsia do lobo temporal mesial. A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia humana, a fisiopatologia é geralmente esclerose hipocampal, a lesão epileptogênica mais encontrada em pacientes com epilepsia (Sharma, Reams et al. 2007). O modelo da pilocarpina é amplamente usado para o estudo do mecanismo de ação e terapia do SE, bem como os mecanismos e prevenção da epileptogênese e neurodegeneração causada pela SE (Andre, Dube et al. 2007; Loscher and Brandt 2010).

A capacidade da pilocarpina induzir SE é provavelmente dependente de ativação do subtipo de receptor muscarínico M1, considerando que em camundongos knockout para receptor M1 não desenvolvem crises em resposta a pilocarpina (Hauser, Annegers et al. 1996). Outros colinomiméticos, como carbacol e oxotremorina, também são capazes de induzir convulsões e danos cerebrais induzidos quando injetado via sistêmica ou diretamente no cérebro (Olney, de Gubareff et al. 1983; Turski, Czuczwar et al. 1983). Além disso, o efeito induzido pela pilocarpina pode ser bloqueado pela administração sistêmica da atropina (antagonista muscarínico), no entanto, uma vez que as crises iniciaram, a sua manutenção depende de outros mecanismos, até mesmo a atropina torna-se ineficaz (Clifford, Olney et al. 1987). Experimentos em cultura de neurônios do hipocampo demonstraram que a ação da pilocarpina nos receptores muscarínicos,

provoca um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, resultando na geração de SE (Priel and Albuquerque 2002). Além disso, estudos de microdiálise *in vivo* revelaram que a pilocarpina provoca uma elevação dos níveis de glutamato no hipocampo após o aparecimento de crises convulsivas. Portanto, há evidências substanciais que sugerem que após o início das crises através dos receptores M1, isso é mantido pela ativação dos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) (Smolders, Khan et al. 1997).

O modelo da pilocarpina, seguido do SE, parece ser altamente isomorfo com a doença humana, por isso, tem sido utilizado em muitos laboratórios, desde a sua primeira descrição a um quarto de século atrás (Turski, Czuczwar et al. 1983; Turski, Ikonomidou et al. 1989). A lesão neuronal causada no modelo da pilocarpina, causa diferentes níveis de intensidade e perfis ao longo do tempo, comparado com modelo do ácido caínico. Sugerindo que essas diferenças no perfil temporal de danos celular devem ser levados em conta durante a pesquisa de agentes neuroprotetores (Covolán and Mello 2000), bem como, o seu uso no estudo da eficácia de drogas antiepilépticas (Leite, Garcia-Cairasco et al. 2002).

3.2 Na⁺, K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína de membrana plasmática que possui um papel crucial na manutenção da homeostase iônica celular (Skou and Esmann 1992; Aperia 2012). A reação básica catalisada pela Na⁺,K⁺-ATPase é o transporte de três íons Na⁺ para o meio extracelular e de dois íons K⁺ para o meio intracelular, usando energia proveniente do ATP (Skou and Esmann 1992; Aperia 2012). Ao regular o gradiente de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática, a Na⁺, K⁺-ATPase regula de maneira indireta a concentração intracelular de outros íons, como Ca²⁺, Cl⁻ e H⁺, e de diversas substâncias como água e glicose (Skou and Esmann 1992; Aperia 2012).

A unidade funcional mínima da Na⁺, K⁺-ATPase é um heterodímero composto por uma subunidade α e uma subunidade β , que pode estar co-localizada com uma proteína da família FXYD denominada alternativamente de subunidade γ ; (Kaplan 2002; Jorgensen, Hakansson et al. 2003). Até o momento foram clonados a partir de

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

A subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos, tem um peso molecular aproximado de 110 kDa e sua estrutura tridimensional tem 10 domínios transmembrana (Kaplan 2002; Jorgensen, Hakansson et al. 2003). A subunidade α contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e também para glicosídeos cardíacos, inibidores específicos da enzima (Kaplan 2002; Jorgensen, Hakansson et al. 2003). A subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase é composta de aproximadamente 370 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 55 kDa (Kaplan 2002; Jorgensen, Hakansson et al. 2003). Esta proteína possui apenas um domínio transmembrana e a porção aminoterminal está exposta ao citosol (Figura 4).

A função exata da subunidade β ainda não está completamente entendida, mas foi demonstrado que a subunidade α não exibe atividade ATPásica quando dissociada da subunidade β . Nesse contexto, tem sido sugerido que as principais funções da subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase estão relacionadas à estabilização da conformação ótima da subunidade α na membrana plasmática, além de uma participação direta no ciclo reacional acoplado ao transporte iônico (Kaplan 2002; Jorgensen, Hakansson et al. 2003). Sendo assim, a subunidade “ β ” é importante na biogênese na enzima, parecendo desempenhar um papel na formação e maturação da haloenzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, na regulação da estabilidade conformacional e na atividade da subunidade “ α ”. Isoformas da subunidade β são diferentemente expressas em neurônios e células gliais. Estudos da expressão de RNAm e proteína têm mostrado que os neurônios são caracterizados pela expressão da isoforma $\beta 1$, enquanto que a isoforma $\beta 2$ é a isoforma predominante na glia. Foi identificado a presença da isoforma $\beta 3$ em neurônios e células da glia no cérebro de ratos por hibridização *in situ*. No entanto, a expressão de $\beta 3$ em proteínas do cérebro de ratos adultos, em culturas de camundongos e astrócitos de rato é muito baixa (Habiba, Blanco et al. 2000).

A subunidade γ da Na^+, K^+ -ATPase modula a afinidade pelos íons e ATP. Reconhecida como membro da família de proteínas FXYD e é composta por aproximadamente 58 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 6,5 k Da

(Therien and Blostein 2000). Esta proteína parece estar presente em quantidades equimolares as das subunidades α e β (Figura 4). A função desta subunidade parece ser controversa na literatura, pois alguns estudos demonstram que a dissociação da subunidade γ do dímero α - β com detergente não iônico, não altera a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, nem mesmo a afinidade por ouabaína ou a expressão funcional da enzima. Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a redução da subunidade γ pela utilização de RNA antisense altera a afinidade por ouabaína, Na^+ , K^+ e ATP. (Therien and Blostein 2000).

As diferenças na sequência primária de aminoácidos entre as 4 subunidades α encontradas até o momento em mamíferos são mínimas, mas resultam em diferenças cruciais, principalmente no que diz respeito à sensibilidade a inibidores, como a ouabaína. De fato, enquanto as isoformas contendo subunidades α_2 ou α_3 possuem uma concentração inibitória de 50% (IC_{50}) para ouabaína de 28,4 nM, as isoformas contendo subunidades α_1 possuem um IC_{50} de 89,4 μM para este mesmo inibidor (Nishi, Fison e al. 1999). Além disso, é importante mencionar que a subunidade α contém os sítios para fosforilação para o PKA (serina 943 em α_1 - α_3) e a PKC (serina 23 em α_1), importantes para regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da Na^+, K^+ -ATPase (Fison, Cheng et al. 1994; Logvinenko, Dulubova et al. 1996).

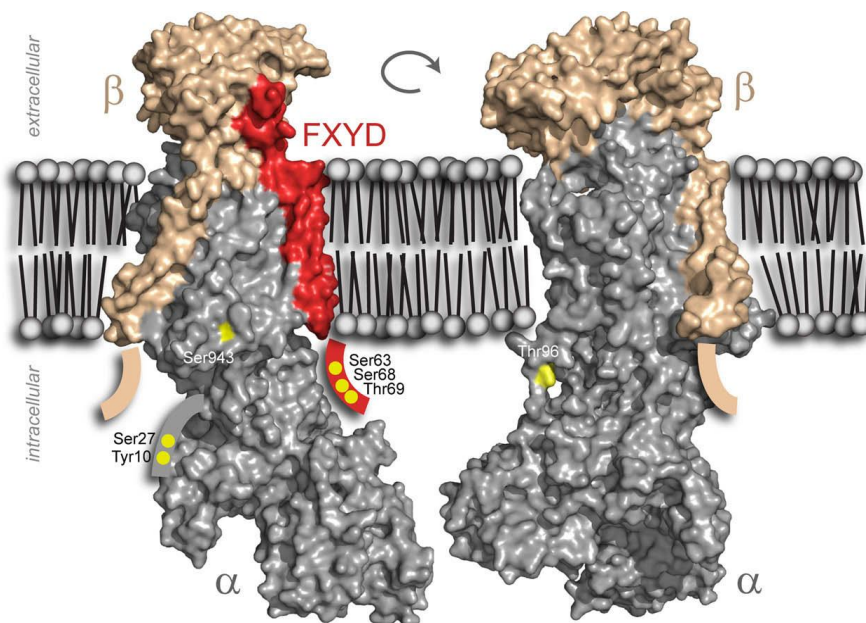


Figura 4: A estrutura apresenta duas visões da subunidade NKA α a baixo, a subunidade β acima, o FXYP a direita e os possíveis sítios de fosforilação (POULSEN et al., 2010)

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

Desse modo, a ouabaína (inibidor da Na^+ , K^+ -ATPase), aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (Fujisawa, Kajikawa et al. 1965), causa convulsões em camundongos (Jamme, Petit et al. 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (Li and Stys 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (Lees, Lehmann et al. 1990). Além disso, a supressão genética da Na^+ , K^+ -ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (Moseley, Williams et al. 2007). Também é importante mencionar que as mutações nos genes que codificam a subunidade α estão associadas com epilepsia em humanos (Jurkat-Rott, Freilinger et al. 2004; Poulsen, Khandelia et al. 2010) e camundongos (Clapcote, Duffy et al. 2009). O grau de inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase induzido pela administração intracerebral de ácido metilmalônico e ácido glutárico se correlaciona positivamente com a duração das crises induzidas por estes agentes (Fighera, Royes et al. 2006; Furian, Fighera et al. 2007). Estes achados corroborando com os resultados de Marquezan e colaboradores (2013), os quais verificaram que a latência para início das crises epilépticas induzidas por PTZ se correlacionam positivamente com a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no córtex cerebral de camundongos, e se correlacionam negativamente com o grau de fosforilação do resíduo de serina 943 na subunidade α da enzima (Marquezan, Funck et al. 2013).

Embora a Na^+ , K^+ -ATPase seja considerada um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia (Aperia 2007; Benarroch 2011), por muito tempo os progressos na área foram limitados pela falta de ferramentas farmacológicas/moleculares que permitissem a modulação da atividade da enzima. Embora moduladores da Na^+ , K^+ -ATPase como os glicosídeos cardíacos sejam

utilizados há muito tempo na prática clínica para tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e alguns tipos específicos de arritmias, estes agentes são inibidores da Na^+ , K^+ -ATPase, o que limita seu uso em condições onde a enzima encontra-se com atividade diminuída (Aperia 2007; Benarroch 2011).

Entre os vários mecanismos envolvidos na regulação da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, a variação na concentração dos substratos Na^+ , K^+ e ATP é um dos mais simples e determinantes, sendo ativada por Na^+ e ATP em sítios intracelulares e por K^+ em um sítio extracelular (Therien and Blostein 2000). O K_m da Na^+ , K^+ -ATPase para o Na^+ está na faixa de 10-40 mM, que na maioria dos tecidos é um valor maior que a concentração intracelular de Na^+ no equilíbrio (Therien and Blostein 2000). Assim, pequenas variações na concentração intracelular de Na^+ afetam profundamente a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na maioria dos tecidos. No caso do K^+ , com K_m em torno de 0,5 – 1,5 mM, tem menos efeito sobre a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase do que variações na concentração intracelular de Na^+ , provavelmente devido à alta afinidade deste íon por seus sítios de ligação na enzima e porque a concentração extracelular de íons K^+ é saturante para os sítios de ligação deste íon na Na^+ , K^+ -ATPase. Por outro lado, tem sido mostrado que o K^+ pode agir como um antagonista competitivo da ligação do Na^+ em seus sítios de ligação na Na^+ , K^+ -ATPase (Therien and Blostein 2000). No que diz respeito ao ATP, a Na^+ , K^+ -ATPase apresenta uma cinética linear e um K_m de 300-800 μM para este substrato (Therien and Blostein 2000).

Entretanto, outro mecanismo importante para regulação da Na^+ , K^+ -ATPase é a fosforilação de resíduos específicos, principalmente na subunidade α . Uma série de hormônios, neurotransmissores e outras substâncias modulam a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase por alterar o estado de fosforilação dos resíduos de serina 943 (α_1 , α_2 e α_3) e serina 23 em α_1 e tirosina 10 (Poulsen, Morth et al. 2010). Os mecanismos pelos quais a fosforilação destes resíduos afeta a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase são variados, e incluem mudanças na afinidade pelos substratos Na^+ , K^+ e ATP e/ou direcionamento e inserção da enzima na membrana plasmática, inibindo ou ativando a enzima, dependendo do tecido e tipo celular estudado.

3.3 Ativador da Na⁺,K⁺-ATPase

A enzima Na⁺, K⁺-ATPase, é uma proteína de membrana plasmática que está presente em quase todas as células eucarióticas (Skou and Esmann 1992). A responsável pela função catalítica da enzima é a subunidade α (Kaplan 2002). Diversas isoformas tanto da subunidade α como da subunidade β foram identificadas (Sweadner 1989). No encéfalo a Na⁺, K⁺-ATPase é amplamente expressa, mais especificamente nos neurônios é expresso $\alpha 1$ e $\alpha 3$ e nos astrócitos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (Azarias, Kruusmagi et al. 2013; Illarionava, Brismar et al. 2014). Existem duas isoformas α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) presente no coração de roedores (Lucchesi and Sweadner 1991; McDonough, Velotta et al. 2002) e as três isoformas α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) no coração de humanos (Wang, Velotta et al. 2001; McDonough, Velotta et al. 2002). Sendo assim, a Na⁺, K⁺-ATPase é um alvo para drogas glicosídicas cardíacas, além de participar da regulação da função cardíaca. Os glicosídeos cardíacos (por exemplo, ouabaína e digitálicos como a digoxina) ligam-se a subunidade α da Na⁺, K⁺-ATPase e inibem a atividade da bomba na elevação da concentração de Na⁺ extracelular, o que inibe ainda mais de o trocador Na⁺- Ca²⁺, aumentando assim, Ca²⁺ intracelular levando a melhoria da função cardíaca (efeito inotrópico positivo) durante a insuficiência cardíaca (Blanco and Mercer 1998). No entanto, essas drogas também produzem efeitos tóxicos graves, incluindo arritmias cardíacas e distúrbios da condução atrioventricular, distúrbios gastrointestinais, efeitos neurológicos, anorexia, visão turva, náuseas e vômitos.

Para explorar novas propriedades estruturais e funcionais da Na⁺, K⁺-ATPase, (Xu 2005) buscou identificar o local de ativação da enzima e seu efeito sobre a atividade e as funções celulares. Os dados experimentais resultaram na identificação de outro sítio de ativação alostérica da enzima que reside nos domínios H7–H8 da subunidade α da enzima. A região extracelular ⁸⁹⁷DVEDSYGQQWTYEQR⁹¹¹ é um importante local de ativação de Na⁺, K⁺-ATPase que é capaz de promover a função catalítica da enzima e regulação da contractilidade cardíaca. Foi demonstrado também que este sítio de ligação descoberto não é o mesmo sítio de ligação da ouabaína (Xu 2005).

O anticorpo SSA412 foi produzido através da sequência de aminoácidos presentes na região D – R que reside no interior do domínio extracelular H7 – H8 da

subunidade α . Comparando a sequência de aminoácidos desta região, (Xu 2005) mostrou que esta sequência de aminoácidos é idêntica nas subunidades $\alpha 1$ entre diferentes espécies e que é altamente conservada, sendo 87% entre as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e 93% entre a subunidade $\alpha 3$ como é demonstrado na figura 5.

Rat	$\alpha 1$	⁸⁹⁷ DVEDSYGQQWTYEQR ⁹¹¹
Human	$\alpha 1$	⁸⁹⁷ DVEDSYGQQWTYEQR ⁹¹¹
Dog	$\alpha 1$	⁸⁹⁵ DVEDSYGQQWTYEQR ⁹⁰⁹
Sheep	$\alpha 1$	⁸⁹⁵ DVEDSYGQQWTYEQR ⁹⁰⁹
Pig	$\alpha 1$	⁸⁹⁵ DVEDSYGQQWTYEQR ⁹⁰⁹
Rat	$\alpha 2$	⁸⁹⁴ DLEDYGQEWTYEQR ⁹⁰⁸
Human	$\alpha 2$	⁸⁹⁴ DLEDYGQEWTYEQR ⁹⁰⁸
Rat	$\alpha 3$	⁸⁸⁷ DLEDYGQQWTYEQR ⁹⁰¹
Human	$\alpha 3$	⁸⁹⁴ DLEDYGQQWTYEQR ⁹⁰¹

Figura 5: Sequência de aminoácidos da região D – R (sítio de ligação do anticorpo SSA412) da subunidade $\alpha 1$ que é idêntica para ratos, humanos, cães, ovelhas e porcos da Na^+, K^+ - ATPase. Também é altamente conservada nas isoformas $\alpha 2$ (87%) e $\alpha 3$ (93%) da enzima.

Além disso, através de técnicas de imunoprecipitação e Western Blot confirmou-se a ligação do anticorpo SSA412 no seu sítio de ligação na enzima Na^+, K^+ -ATPase. Verificou-se a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, através da incubação de vesículas cardíacas isoladas de coração de rato com o anticorpo SSA412 em diferentes concentrações, constatando que o aumento da atividade da enzima é dose-dependente. Em outro estudo, foi demonstrado que o anticorpo SSA412 aumenta a atividade da Na^+, K^+ -ATPase o que induz inotropismo positivo no coração intacto de rato *in vivo* (Xu, Takimoto et al. 2006).

O DRRSAb anticorpo produzido pelo Dr. James W. Larrick no Instituto de Pesquisa Panorama, também é um anticorpo específico para uma região D – R da Na^+, K^+ -ATPase, e do mesmo modo produz efeitos cardioprotetores (Zheng, Koh et al. 2011). A ativação da Na^+, K^+ -ATPase com DRRSAb pode produzir efeitos inotrópicos positivos e cardioprotetores ativando a via das quinases reguladas por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2) e fosfoinositol 3-quinase (PI3K)/Akt.

Esta propriedade única é de primordial importância clínica, devido ao fato de a maioria, se não todas, as drogas disponíveis na clínica atualmente para tratamento da insuficiência cardíaca ser potencialmente cardiotoxícas (Zheng, Koh et al. 2011).

4. ARTIGO



Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit



Vinícius Rafael Funck^a, Leandro Rodrigo Ribeiro^a,
 Leticia Meier Pereira^a, Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a,
 Jéssica Grigoletto^a, Michele Rechia Figuera^{a,b},
 Luiz Fernando Freire Royes^{a,b}, Ana Flávia Furian^a,
 Mauro Schneider Oliveira^{a,b,*}

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

^b Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Received 5 June 2014; received in revised form 20 August 2014; accepted 21 September 2014
 Available online 28 September 2014

KEYWORDS

Epilepsy;
 Pilocarpine;
 Sodium pump;
 Nitrotyrosine

Abstract Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of epilepsy with about one third of TLE patients being refractory to antiepileptic drugs. Knowledge about the mechanisms underlying seizure activity is fundamental to the discovery of new drug targets. Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity contributes to the maintenance of the electrochemical gradients underlying neuronal resting and action potentials as well as the uptake and release of neurotransmitters. In the present study we tested the hypothesis that decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity is associated with changes in the alpha subunit phosphorylation and/or redox state. Activity of Na⁺,K⁺-ATPase decreased in the hippocampus of C57BL/6 mice 60 days after pilocarpine-induced status epilepticus (SE). In addition, the Michaelis–Menten constant for ATP of $\alpha 2/3$ isoforms increased at the same time point. Nitration of the α subunit may underlie decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity,

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, no. 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900, Santa Maria. RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.
 E-mail address: ms.oliveira@ufsm.br (M.S. Oliveira).

however no changes in expression or phosphorylation state at Ser⁹⁴³ were found. Further studies are necessary define the potential of nitrated Na⁺,K⁺-ATPase as a new therapeutic target for seizure disorders.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Epilepsy is one of the most common serious neurological condition and a major worldwide public health problem (Schmidt and Sillanpaa, 2012). Accordingly, the World Health Organization (2006) estimates that epilepsy may contribute around 1% of the global total of days lost due to disease, and about 7.9% of the disability-adjusted life years caused by neurological disorders. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of human epilepsy, and is usually triggered by an initial precipitating injury such as *status epilepticus* (SE), head trauma, childhood febrile seizures, or hypoxia (Acharya et al., 2008). Importantly, pharmacological treatment of TLE is completely effective in controlling the seizures in fewer than 20% of patients (Schmidt and Sillanpaa, 2012). In this context, knowledge about the mechanisms underlying seizure activity is fundamental to discovery of new drug targets.

Compelling evidence indicates that Na⁺,K⁺-ATPase plays a role in several neurological disorders, including seizure activity, and therefore may constitute a potential new target for treatment of these conditions (Aperia, 2007; Benarroch, 2011). In the brain, the activity Na⁺,K⁺-ATPase contributes crucial for maintaining the electrochemical gradient responsible for the resting potential and action and uptake and release of neurotransmitters, and as a consequence, a decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity critically affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as animal behavior (Moseley et al., 2007). For instance, the Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor ouabain elicits electrographically-recorded seizures in mice (Doggett et al., 1970), and Na⁺,K⁺-ATPase activity and phosphorylation state of serine 943 (Ser⁹⁴³) at the α subunit strongly correlate with the latency to seizures induced by pentylentetrazol in mice (Marquezan et al., 2013). Moreover, mutations in the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene have been found in mice and humans presenting epileptic phenotype (Clapcote et al., 2009; Deprez et al., 2008; Poulsen et al., 2010). Nevertheless, there is little evidence on the mechanisms underlying a decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after SE. Therefore, the present study aimed to test the hypothesis that a decrease in Na⁺,K⁺-ATPase after SE is associated with changes in the alpha subunit phosphorylation and/or redox state.

Methods

Adult male C57BL/6 male mice (12–20 g) with 30–45-day-old were used. All animal experimentation reported in this study has been conducted in accordance with national and international legislation and with the approval of the Institutional Committee on Animal Use and Care of the Federal University of Santa Maria (process #37/2012).

SE was induced by pilocarpine following standard procedures (Borges et al., 2003) and neurochemical analyzes

were performed at two months after SE. For this purpose animals were euthanized by pentobarbital (180 mg/kg, i.p.) and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. The hippocampus was rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish and homogenized in the proper solution for each subsequent neurochemical analyzes. Given the small size of mouse hippocampus and therefore the limited amount of sample per animal we used different subjects in each set of neurochemical analysis. Detail of the animals and reagents used, procedures for SE, Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements, immunodetection of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, immunoprecipitation and statistical analyzes are described in the Supplemental methods section.

Results

Statistical analyzes revealed a decrease of total Na⁺,K⁺-ATPase activity in the mice hippocampus two months after pilocarpine-induced SE [$t(6) = 2.979$; $P < 0.05$ —Fig. 1A]. In addition, we investigated whether some α isoform is selectively decreased following SE. We found that $\alpha 1$ [$t(6) = 3.240$; $P < 0.05$ —Fig. 1B] and $\alpha 2/\alpha 3$ [$t(6) = 2.546$; $P < 0.05$ —Fig. 1C] Na⁺,K⁺-ATPase activities are decreased in the hippocampus two months after SE. No changes in Na⁺,K⁺-ATPase activities were found at the other time points analyzed (24 h or 7 days after SE).

Functional analysis of the ATP dependence of Na⁺,K⁺-ATPase activity revealed that the K_m for ATP of total or $\alpha 1$ Na⁺,K⁺-ATPase activities was not altered following pilocarpine-induced SE (Fig. 2A and B, respectively). On the other hand, a significant increase in the K_m for ATP of the $\alpha 2/\alpha 3$ isoforms was found two months after SE [$t(8) = 2.722$; $P < 0.05$ —Fig. 2C].

In order to investigate the mechanism underlying decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced SE we measured Na⁺,K⁺-ATPase α subunit immunoreactivity and its state of phosphorylation at Ser⁹⁴³. Statistical analyzes revealed that α subunit immunoreactivity was not altered in hippocampus of epileptic mice (Fig. 3A), suggesting that the currently reported decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity was not due to a reduction in enzyme content. In addition, phosphorylated Ser⁹⁴³ immunoreactivity did not change after SE (Fig. 3B and C).

Since decreased expression or altered Ser⁹⁴³ phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit seems not to underlie the decrease in enzyme activity, we investigated whether oxidative modifications of the α subunit were associated with decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity two months after SE. Na⁺,K⁺-ATPase α subunit was immunoprecipitated from mice hippocampus and the oxidative stress markers 3-NT, HNE and protein carbonyls were measured. Interestingly, we found an increase in the nitration ratio of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit [$t(8) = 3.016$; $P > 0.05$ —Fig. 4A]. On the other hand, no

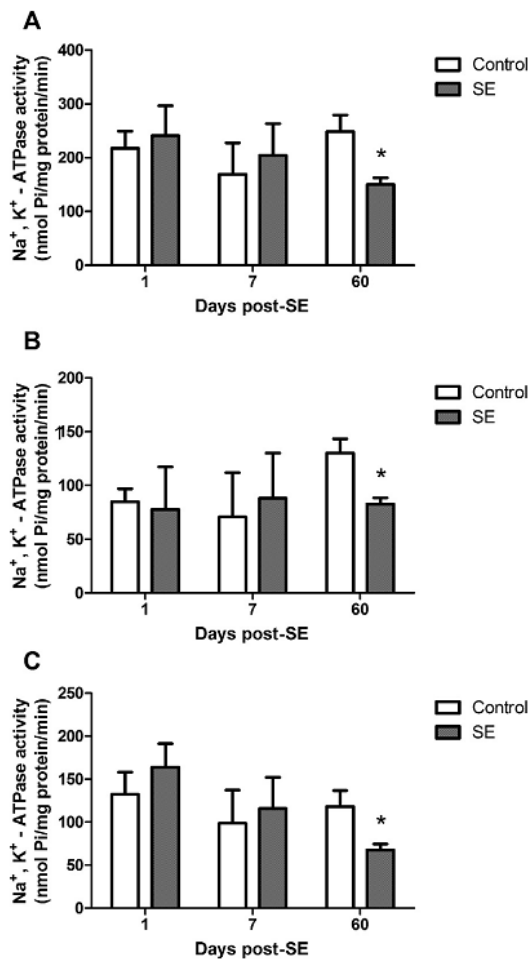


Fig. 1 Reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampi of mice after pilocarpine-induced SE. (A) Total, (B) α1 or (C) α2/3 Na⁺,K⁺-ATPase activities were measured at 24 h, 7 days or two months after pilocarpine-induced SE. Data are presented as mean ± SEM for *n* = 4 in each group. The asterisk indicates a statistically significant difference (*P* < 0.05) compared with the respective age-matched control group (Student's *t* test).

changes in the HNE or protein carbonyls content of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit were found (Fig 4B and C, respectively).

Discussion

Compelling evidence indicates that Na⁺,K⁺-ATPase is a major regulator of brain excitability (Aperia, 2007; Benarroch, 2011). For instance, *in vitro* pharmacological decrease of Na⁺,K⁺-ATPase with ouabain increases the frequency of spontaneous postsynaptic potentials and decreases the amplitude and duration of CA3 pyramidal cell after hyperpolarization in hippocampal slices (Haglund and Schwartzkroin, 1990), and decreases [³H]-glutamate uptake in rat forebrain synaptosomes and cultured astrocytes (Rose et al., 2009). Moreover, the

partial Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor dihydro-ouabain decreases the amplitude of GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in rat CA1 hippocampal neurons (Vaillend et al., 2002). Further evidence supporting the close relationship between decreased Na⁺,K⁺-ATPase and brain hyperexcitability comes from the study by Clapcote et al. (2009), who have identified a mutant mice (Myshkin, *Myk* mice) presenting complex partial and secondarily generalized seizures. It has been demonstrated that *Myk* mice carry a mutation (I810N) which renders the normally expressed Na⁺,K⁺-ATPase α3 isoform inactive (Clapcote et al., 2009). Accordingly, reduced total Na⁺,K⁺-ATPase activity greatly reduced threshold for *in vitro* hippocampal epileptiform activity elicited by bath superfusion with Mg²⁺-free artificial cerebrospinal fluid. Moreover, hippocampal slices from *Myk* mice display enhanced excitation-spike coupling after theta burst stimulation, indicating hyperexcitability after physiological patterns of high-frequency synaptic activity (Clapcote et al., 2009), further evidencing that decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity is sufficient to render an epileptic phenotype.

In the present study we show a long term decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity after a single episode of pilocarpine-induced SE. To some extent, these data are agreement with previous studies reporting a decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the epileptic human and rodent brain. For instance, Na⁺,K⁺-ATPase activity has been found to be significantly reduced in the epileptic human cortex when compared with the nonepileptic tissue (Rapport et al., 1975). Moreover, decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity has been reported in highly enriched glial cell or synaptosomal fractions obtained from temporal neocortex of patients with hippocampal-amygdalar epilepsy and hippocampal sclerosis (Grisar and Delgado-Escueta, 1986). Decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity has been also reported in the chronic period of the experimental epilepsy induced by a single injection of ferrous/ferric chloride into the rat somatosensory cortex (Mishra et al., 2010). In addition, it has been shown that Na⁺,K⁺-ATPase activity and its K⁺-mediated activation are decreased in glial fractions prepared from the primary epileptogenic focus 15 days after the freezing lesion in the cerebral cortex of cats (Grisar et al., 1983).

One interesting point to consider is whether the presently reported decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity depends on the active seizure state of the post SE animal. In the present study we did not perform systematic observations to detect spontaneous seizures, and thus it is hard to suggest whether there is a correlation between spontaneous seizure frequency and/or severity and Na⁺,K⁺-ATPase activity. Nevertheless, in a previous study we showed that Na⁺,K⁺-ATPase activity correlated positively with the latency to clonic and generalized seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), whereas Ser943 phosphorylation correlated negatively with the latency to PTZ-induced generalized seizures (Marquezan et al., 2013). On the other hand, in the present study we did not detect significant changes in the phosphorylation state of Ser943 between post SE and aged-matched controls. Since the mechanism underlying the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity markedly differ between these acute and chronic conditions, the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity two months after SE is possibly one of the multiple mechanisms that ultimately lead to the maintenance of the

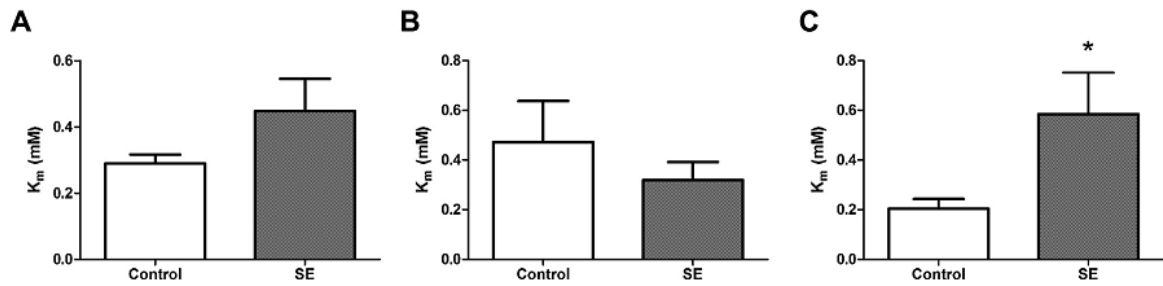


Fig. 2 Substrate affinity analysis of Na^+, K^+ -ATPase activity in the mice hippocampus two months after pilocarpine-induced SE. In this set of experiments the Michaelis–Menten constant (K_m) for ATP was calculated for (A) total (B) $\alpha 1$ or (C) $\alpha 2/3$ Na^+, K^+ -ATPase activities. Data are presented as mean + SEM for $n = 4-6$ in each group. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective age-matched control group (Student's t test).

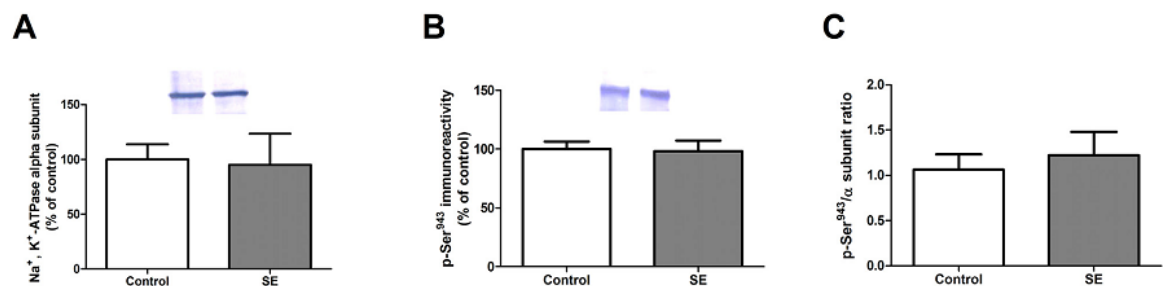


Fig. 3 Na^+, K^+ -ATPase content and specific Ser943 phosphorylation in the mice hippocampus two months after pilocarpine-induced SE. In this set of experiments the immunocontent of (A) total Na^+, K^+ -ATPase α subunit, (B) Na^+, K^+ -ATPase α subunit phosphorylated at Ser943 and the (C) ratio between p-Ser943 and α subunit were measured. Data are presented as mean + SEM for $n = 4$ in each group. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective age-matched control group (Student's t test).

epileptic state, rather than a consequence of spontaneous seizures.

Regarding the mechanism for decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in epileptic animals, it seems not related to changes in the content of the catalytic α subunit of the enzyme or its

state of phosphorylation at Ser⁹⁴³. Nevertheless, we found an increased 3-NT/ Na^+, K^+ -ATPase α subunit ratio, indicating that levels of nitrated Na^+, K^+ -ATPase are increased in the mice hippocampus two months after pilocarpine-induced SE. These data are in agreement with those by (Ryan et al.,

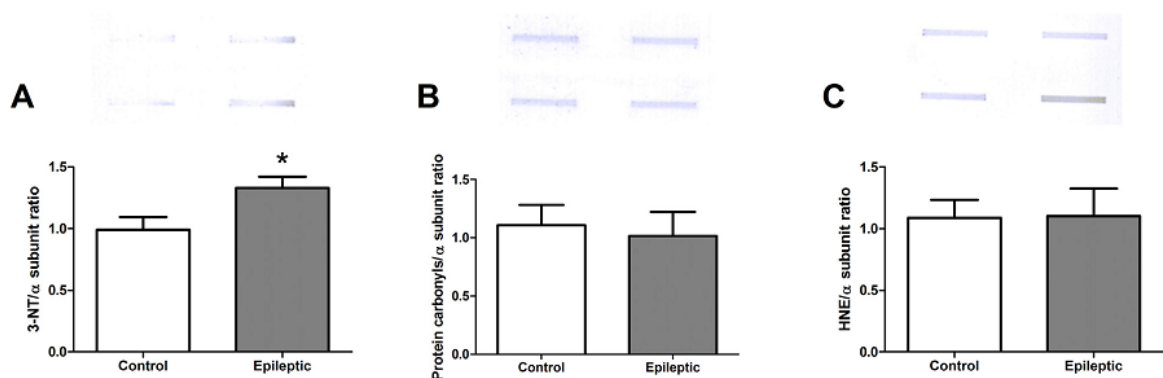


Fig. 4 Analysis of oxidative/nitrosative modifications in Na^+, K^+ -ATPase α subunit from mice hippocampus two months after pilocarpine-induced SE. In this set of experiments the Na^+, K^+ -ATPase α subunit was immunoprecipitated from mice hippocampus and the immunocontent of (A) 3-nitrotyrosine (B) protein carbonyls or (C) 4-hydroxy-2-nonenal were measured. Data are presented as mean + SEM for $n = 5$ in each group. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective age-matched control group (Student's t test).

2013), who demonstrated that total protein nitration (as measured by 3-NT levels) is progressively increased in rat hippocampal neurons 6 weeks after kainic acid-induced SE. However, it must be pointed out that it is not clear how nitration of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit leads to decreased enzyme activity. For instance, although it has been demonstrated that Na⁺,K⁺-ATPase is a target for peroxynitrite-mediated nitration *in vitro* (Golden et al., 2003), a decrease in total Na⁺,K⁺-ATPase activity after neonatal hypoxia–ischemia in piglets (Golden et al., 2001) appears to occur even in the absence of increased $\alpha 3$ subunit nitration (Golden et al., 2003). Further studies are needed to clarify this point, but it is important to mention that irrespectively of the mechanism, present data suggest that Na⁺,K⁺-ATPase is a target for protein nitration long term after SE. Since irreversible posttranslational modifications such as nitration are usually associated with permanent loss of function (Dalle-Donne et al., 2006), nitration of Na⁺,K⁺-ATPase α subunit could represent a new mechanism for cellular dysfunction following SE.

Another interesting point to consider is the presently reported increase in the Michaelis–Menten constant (*i.e.* the K_m) for the main Na⁺,K⁺-ATPase substrate ATP in the epileptic mice hippocampus. This effect seems to be selective for Na⁺,K⁺-ATPase $\alpha 2/3$ isoforms, and suggests that their affinity for ATP is reduced in the hippocampus of epileptic mice. Importantly, the reduced affinity of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase for ATP could be aggravated by the mitochondrial energy metabolism dysfunction which has been established in the mice hippocampus in the chronic phase of TLE (Smeland et al., 2013). In fact, decreased hippocampal contents of the reducing nucleotide NADPH and the tricarboxylic acid cycle intermediate succinate as well as a reduction in ¹³C enrichment of citrate and malate were found in the mice hippocampus 3.5–4 weeks following pilocarpine-induced SE.

In summary, in the present study we showed that Na⁺,K⁺-ATPase activity is decreased in the hippocampus of mice two months after a single SE episode. This effect seems not linked with changes in the α subunit of the enzyme or its state of phosphorylation at Ser⁹⁴³, but may be associated with increased nitration of the α subunit.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to V.R.F., L.R.R., C.V.O.), CNPq/Pibic (to L.M.P.) and Fapergs/Probic (to J.G.). M.R.F., L.F.F.R., A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. This work was supported by CNPq grant #471666/2013-0 (Universal) to M.S.O. The authors thank Dr. Carlos Fernando de Mello for valuable comments and for kindly providing laboratory facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.09.025>.

References

- Acharya, M.M., Hattiangady, B., Shetty, A.K., 2008. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 84, 363–404.
- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J. Intern. Med.* 261, 44–52.
- Benarroch, E.E., 2011. Na⁺,K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76, 287–293.
- Borges, K., Gearing, M., McDermott, D.L., Smith, A.B., Almonte, A.G., Wainer, B.H., Dingledine, R., 2003. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol.* 182 (1), 21–34.
- Clapcote, S.J., Duffy, S., Xie, G., Kirshenbaum, G., Bechard, A.R., Rodacker Schack, V., Petersen, J., Sinai, L., Saab, B.J., Lerch, J.P., Minassian, B.A., Ackerley, C.A., Sled, J.G., Cortez, M.A., Henderson, J.T., Vilsen, B., Roder, J.C., 2009. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14085–14090.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601–623.
- Deprez, L., Weckhuysen, S., Peeters, K., Deconinck, T., Claeys, K.G., Claes, L.R., Suls, A., Van Dyck, T., Palmieri, A., Matthijs, G., Van Paesschen, W., De Jonghe, P., 2008. Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. *Epilepsia* 49, 500–508.
- Doggett, N.S., Spencer, P.S., Turner, T.A., 1970. The pharmacological effects of ouabain administered intracerebrally to conscious mice. *Br. J. Pharmacol.* 40, 138P–139P.
- Golden, W.C., Brambrink, A.M., Traystman, R.J., Martin, L.J., 2001. Failure to sustain recovery of Na,K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic–ischemic newborn piglets. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 88, 94–102.
- Golden, W.C., Brambrink, A.M., Traystman, R.J., Shaffner, D.H., Martin, L.J., 2003. Nitration of the striatal Na,K-ATPase alpha3 isoform occurs in normal brain development but is not increased during hypoxia–ischemia in newborn piglets. *Neurochem. Res.* 28, 1883–1889.
- Grisar, T., Delgado-Escueta, A.V., 1986. Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K⁺ activation of Na⁺,K⁺-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. *Brain Res.* 364, 1–11.
- Grisar, T., Franck, G., Delgado-Escueta, A.V., 1983. Glial contribution to seizure: K⁺ activation of (Na⁺,K⁺)-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes of epileptogenic cortex. *Brain Res.* 261, 75–84.
- Haglund, M.M., Schwartzkroin, P.A., 1990. Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 63, 225–239.
- Marquezan, B.P., Funck, V.R., Oliveira, C.V., Pereira, L.M., Araujo, S.M., Zarzecki, M.S., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., 2013. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na(+),K(+)-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 105, 396–400.
- Mishra, M., Singh, R., Sharma, D., 2010. Antiepileptic action of exogenous dehydroepiandrosterone in iron-induced epilepsy in rat brain. *Epilepsy Behav.* 19, 264–271.
- Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B., 2007. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J. Neurosci.* 27, 616–626.

- Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., Nissen, P., 2010. Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 584, 2589–2595.
- Rapport 2nd, R.L., Harris, A.B., Friel, P.N., Ojemann, G.A., 1975. Human epileptic brain Na,KATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch. Neurol.* 32, 549–554.
- Rose, E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., Hampson, D.R., 2009. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* 29, 8143–8155.
- Ryan, K., Liang, L.P., Rivard, C., Patel, M., 2013. Temporal and spatial increase of reactive nitrogen species in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 64, 8–15.
- Schmidt, D., Sillanpaa, M., 2012. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr. Opin. Neurol.* 25, 159–163.
- Smeland, O.B., Hadera, M.G., McDonald, T.S., Sonnewald, U., Borges, K., 2013. Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1090–1097.
- Vaillend, C., Mason, S.E., Cuttle, M.F., Alger, B.E., 2002. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J. Neurophysiol.* 88, 2963–2978.
- World Health Organization, 2006. *Neurological Disorders: Public Health Challenges*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Supplementary Data

Methods

Animals

C57BL/6 male mice (12-20g; 30-45-day-old) were maintained under controlled environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55 % relative humidity) with free access to food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water. All protocols were conducted in accordance with national (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and international legislation (ARRIVE guidelines), and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process #037/2012).

Reagents

Reagents for western blot were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) or from Pierce (Rockford, IL USA). Primary antibodies raised against Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, phosphorylated Ser943, 3-Nitrotyrosine and 4-Hydroxy-2-Nonenal were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), catalog numbers sc-28800 (RIID: AB_2290063), sc-16710-R (RIID: AB_667810), sc-55256 (RIID: AB_1126663) and sc-130083 (RIID: AB_1249310) respectively. The Oxyblot™ kit was purchased from EMD Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). All the other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Pilocarpine-induced SE

SE was induced in C57BL/6 mice following standard procedures (Borges et al., 2003). Briefly, animals received a single methylscopolamine bromide injection (1 mg/kg in 0.9 % NaCl; subcutaneous) 30 min prior to administration of pilocarpine to minimize peripheral cholinergic effects. A single injection of pilocarpine (320 mg/kg in 0.9 % NaCl;

intraperitoneal) was used to elicit SE. If during the first hour the animal was not in SE, a second dose of 225 mg/Kg of pilocarpine were injected, and if 40 minutes after de second dose the mice not entry in SE another injection of pilocarpine (225 mg/Kg) were injected, thus, the maximum number of repeated pilocarpine injections was restricted to three. SE was defined as continuous limbic seizure activity characterized by head nodding and gnawing beginning after a generalized seizure. SE was terminated after 60 min with diazepam (20 mg/kg, i.p.). Controls animals received methylscopolamine and diazepam, but received 0.9 % NaCl solution instead of pilocarpine. All mice were hand-fed with moistened chow and fresh fruits (apples and bananas) and injected with 5% dextrose in lactated Ringer's solution for three days following the SE or control procedure for animal welfare purposes.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements

The hippocampi were rapidly dissected on an inverted Petri dish placed on ice, and gently homogenized in ice-cold 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity (Oliveira et al., 2009). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂ and 50 µg of protein in the presence or absence of ouabain (4 µM or 3 mM), in a final volume of 350 µl. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 µl of 50 % (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for nonenzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925). Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min. In a separate set of

experiments we tested the ATP dependence of Na⁺,K⁺-ATPase activity (Clapcote et al., 2009). In these experiments the hippocampi of control and SE mice (two months after SE) were dissected out and activity of Na⁺,K⁺-ATPase measured under seven different ATP concentrations (0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1 or 3 mM). The stoichiometry between Mg²⁺ and ATP was observed and kept constant in these experiments. The Michaelis-Menten constant (K_m) for ATP was then calculated using the nonlinear fit function of Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Western blot

Na⁺,K⁺-ATPase α subunit content and its state of phosphorylation at Ser⁹⁴³ was evaluated by western blot according to Marquezan et al. (2013). Briefly, animals were euthanized by pentobarbital (180 mg/kg, i.p.) and the hippocampus was rapidly dissected on an inverted Petri dish placed on ice, and gently homogenized 1:5 (w/v) in ice-cold T-PER tissue protein extraction reagent (Pierce) supplemented with Halt Protease Inhibitor cocktail (Pierce). Homogenates were centrifuged at 10,000 x g at 4 °C for 5 min and supernatants were collected. An aliquot (20 μ g protein) of the supernatant was mixed with SDS loading buffer and boiled for 10 min. Proteins were then subjected to an 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline, (TBS) for 1 h and incubated overnight at 4 °C with a 1:5000 dilution of anti-Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, or anti-p-Ser⁹⁴³ antibodies in TBS containing 2.5% BSA. Membranes were washed three times in Tris-buffered saline, containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and incubated for 1 h with biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:10000, Sigma-Aldrich) in TBS containing 2.5% BSA. Membranes were washed three more times and incubated for 1 h with a streptavidin peroxidase polymer (1:10000, Sigma Aldrich) in TBS containing 2.5% BSA.

Blots were developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, dried, scanned, and quantified with ImageJ software (RIID: nif-0000-30467). Protein extracts of control and SE mice were processed in parallel on a single gel and subjected to same immunoblotting procedure. Immunoreactivity was normalized in relation to the level of respective average of age-matched control samples. Normalized data was then used to calculate the ratio between p-Ser⁹⁴³ and α subunit immunoreactivity in an individual basis. Ponceau staining served as the transfer control (Romero-Calvo et al., 2010).

Immunoprecipitation

Hippocampi were rapidly dissected and gently homogenized as described above for western blot assays, and 500 μ g of protein were subjected to immunoprecipitation (de Oliveira et al., 2013) and subsequent determination of 4-hydroxy-2-nonenal protein-adducts (HNE), protein carbonyls and 3-nitrotyrosine (3-NT) content by slot blot. Briefly, homogenates were precleared with protein A/G-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h and incubated overnight with a 1:250 dilution of anti-Na⁺,K⁺-ATPase α subunit or control IgG. Next, samples were incubated for 2 h with protein A/G-agarose beads and subjected to centrifugation at 1000 \times g for 1 min. Pellets were collected, washed three times with T-PER protein extraction reagent, and resuspended in SDS loading buffer. After boiling for 10 min, samples were centrifuged at 1000 g for 1 min and the supernatant was used for detection of Na⁺,K⁺-ATPase, 3-NT, carbonyl and HNE by slot blot, as described below.

Slot Blot

Oxidative modifications to the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit were determined by measuring levels of HNE, protein carbonyls and 3-NT by slot blot following immunoprecipitation. Slot blots were performed as described in detail by Joshi et al. (2006).

Briefly, 10 μg of protein was loaded in each well on a nitrocellulose membrane under vacuum using a slot blot apparatus (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline, (TBS) for 1 h and incubated for 4 h at 4 °C with a dilution of anti-HNE (1:2500), anti-DNP (1:100), anti-3-NT (1:5000) or anti- Na^+, K^+ -ATPase α subunit (1:5000) antibodies in TBS containing 2.5% BSA. Membranes were subsequently developed and quantified as described above for western blot assays. The ratio between oxidative/nitrosative stress markers and α subunit immunoreactivity was calculated as described above for p-Ser⁹⁴³ and α subunit ratio. Control blots were obtained by omitting primary antibodies in the whole procedure (Joshi et al., 2006).

Protein determination

Protein content was measured spectrophotometrically by the bicinchoninic acid method using a commercially available kit (Pierce BCA Protein Assay Kit). Bovine serum albumin (1 mg/mL) was used as standard.

Statistical analyses

Data were analyzed by the unpaired Student's *t* test, and expressed as mean and standard error of the mean. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

References

- Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingledine R. (2003) Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol* 182:21-34.
- Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Rodacker Schack V, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Minassian BA, Ackerley CA, Sled JG, Cortez MA, Henderson JT, Vilsen B, Roder JC. (2009) Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14085-14090.
- de Oliveira CV, Funck VR, Pereira LM, Grigoletto J, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS. (2013) Atorvastatin withdrawal elicits oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex. *Pharmacol Res* 71:1-8.
- Fiske CH, Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry* 66:375-400.
- Joshi G, Perluigi M, Sultana R, Agrippino R, Calabrese V, Butterfield DA. (2006) In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Neurochem Int* 48:318-327.
- Marquezan BP, Funck VR, Oliveira CV, Pereira LM, Araujo SM, Zarzecki MS, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS. (2013) Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy Res* 105:396-400.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF. (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-

ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416-426.

Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318-320.

5. MANUSCRITO

Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models

Vinícius Rafael Funck¹, Leandro Rodrigo Ribeiro¹, Letícia Meier Pereira¹, Clarissa Vasconcelos de Oliveira¹, Jéssica Grigoletto¹, Iuri Domingues Della-Pace², Michele Rechia Fighera^{1,2}, Luiz Fernando Freire Royes^{1,2}, Ana Flávia Furian¹, James W. Larrick³, Mauro Schneider Oliveira^{1,2,*}

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

²Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

³Panorama Research Institute, 1230 Bordeaux Dr, Sunnyvale, CA 94089, United States of America

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@ufsm.br

Phone: 55 55 3220 9378

Fax: 55 55 3220 8241

Running title: Na⁺, K⁺-ATPase in temporal lobe epilepsy

Key words: Epilepsy, Pilocarpine, seizure, EEG, sodium pump

Abstract

Epilepsy is a life-shortening brain disorder affecting approximately 1% of the worldwide population. Most epilepsy patients are refractory to currently available antiepileptic drugs (AEDs). Knowledge about the mechanisms underlying seizure activity and probing for new AEDs is fundamental to the discovery of new therapeutic strategies. Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity contributes to the maintenance of the electrochemical gradients underlying neuronal resting and action potentials as well as the uptake and release of neurotransmitters. Accordingly, a decrease of Na⁺, K⁺-ATPase increases neuronal excitability may predispose to appearing of seizure activity. In the present study, we tested the hypothesis that activation of Na⁺, K⁺-ATPase activity with a specific antibody (DRRSAb) raised against a regulatory site in the α subunit would decrease seizure susceptibility. We found that incubation of hippocampal homogenates with DRRSAb (1 μ M) increased total and α 1 Na⁺, K⁺-ATPase activities. A higher concentration (3 μ M) increased total, α 1 and α 2/ α 3 Na⁺, K⁺-ATPase activities. Intrahippocampal injection of DRRSAb decreased the susceptibility of post *status epilepticus* animals to pentylenetetrazol (PTZ)-induced myoclonic seizures. In contrast, administration of DRRSAb into the hippocampus of naïve animals facilitated the appearance of PTZ-induced seizures. Quantitative analysis of hippocampal EEG recordings revealed that DRRSAb increased the percentage of total power contributed by delta frequency band (0-3 Hz) to large irregular amplitude pattern of hippocampal EEG. On the other hand, we found no DRRSAb-induced changes regarding the theta functional state. Further studies are necessary define the potential of Na⁺, K⁺-ATPase activation as a new therapeutic approach for seizure disorders.

Keywords: Epilepsy; Pilocarpine; seizure; EEG; sodium pump

Highlights

- DRRSAb antibody increases Na^+ , K^+ -ATPase activity in mice hippocampus.
- A direct Na^+ , K^+ -ATPase activator delays PTZ-induced seizures in post-*SE* mice.
- Na^+ , K^+ -ATPase activation facilitates PTZ-induced seizures in naïve mice.
- Delta frequency band to LIA pattern shifted after DRRSAb injection.

Introduction

Epilepsy is a disease of the brain defined by the presence of a pathologic and enduring tendency to have recurrent seizures (Fisher et al., 2014), and is associated with substantial comorbidity, including depression, anxiety and increased mortality (Tellez-Zenteno et al., 2007). It is considered a major worldwide public health problem being second most frequent serious neurological condition after stroke (Schmidt and Sillanpaa, 2012). The World Health Organization estimates that epilepsy contributes 1 % of the global total of work days lost due to disease, and 7.9% of the disability-adjusted life years lost due to neurological disorders (World Health Organization, 2006). In addition, the serious nature of epilepsy is further aggravated by the fact that seizures of one-third of patients are inadequately controlled by current pharmacological treatments (Schmidt and Sillanpaa, 2012). In this context, comprehension of the molecular basis of seizure onset and maintenance, as well as probing for new targets for antiepileptic drugs is part of the development of new therapeutic strategies.

One potential candidate for pharmacological control of seizure activity is the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3.6.3.9) (Aperia, 2007, Benarroch, 2011, de Lores Arnaiz and Ordieres, 2014). This pump is a crucial protein responsible for the electrochemical gradient of Na^+/K^+ across the cell plasma membranes. As a consequence, Na^+ , K^+ -ATPase regulates a wide range of cellular responses, including neuronal excitability and the release of neurotransmitters, which are critical phenomena associated with seizure activity. In fact, compelling evidence indicates that reduced Na^+ , K^+ -ATPase activity predisposes to seizures. For instance, mutations in the Na^+ , K^+ -ATPase α subunit gene have been found in epileptic mice and humans diagnosed with epilepsy (Deprez et al., 2008, Clapcote et al., 2009, Poulsen et al., 2010), and other neurological disorders associated with seizures, such as familial hemiplegic migraine type 2, rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and alternating hemiplegic childhood (AHC) (Gritz and Radcliffe, 2013; Heinzen et al., 2014). Moreover, Na^+ , K^+ -

ATPase activity decreases in the epileptic human cerebral cortex (Rapport et al., 1975, Grisar and Delgado-Escueta, 1986) and in the brain of rodents after acute seizures induced by the classical convulsant pentylenetetrazol (PTZ) (Schneider Oliveira et al., 2004, Marquezan et al., 2013). If decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity plays a causal role in seizure generation, enzyme activation would decrease seizure activity. Therefore, we aimed the present study to test the hypothesis that pharmacological activation of Na^+ , K^+ -ATPase may constitute a new strategy to counteract seizures.

Experimental procedures

Animals

Adult C57BL/6 male mice (25-40 g) were maintained under controlled environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55 % relative humidity) with free access to food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water. All protocols followed national (guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and international legislation (ARRIVE guidelines). The Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria approved the present study (Process #071/2013).

Drugs and reagents

The polyclonal antibody DRRSAb, raised against the $^{897}\text{DVEDSYGQQWTYEQR}^{911}$ (D-R) region of α -subunit of Na^+ , K^+ -ATPase (Zheng et al., 2011), was kindly provided by Dr. James W. Larrick (Panorama Research Inc., Sunnyvale, CA, USA). The D-R region of Na^+ , K^+ -ATPase α -subunit contains an activation site whose binding of antibodies increase in Na^+/K^+ active transport probably by changes in tridimensional protein conformation which ultimately results in increased $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ affinity (Xu, 2005). Normal rabbit IgG was from

Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All other reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Na⁺, K⁺-ATPase activity

We assessed the effect of DRRSAb on hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity since previous studies with this antibody have focused on the cardiac enzyme (Zheng et al., 2011). For this purpose, naïve mice were euthanized by decapitation and the hippocampus was gently homogenized in ice-cold 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and centrifuged at 1000 x g for 5 min at 4 °C. The supernatant (50 µg protein) was incubated for 30 min at 37°C with 1 or 3 µM of DRRSAb (Zheng et al., 2011). After incubation Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured according to Oliveira and colleagues (2009). In order to determine whether some Na⁺,K⁺-ATPase α isoform is selectively activated by DRRSAb we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al., 1999). Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain). Total Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured using 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms) whereas α_2/α_3 Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured in presence of 3 µM ouabain (that inhibits Na⁺,K⁺-ATPase isoforms containing α_2 and α_3 subunits). The α_1 Na⁺,K⁺-ATPase activity was then calculated by subtracting the α_2/α_3 activity from the total activity.

Experimental design

In order to investigate the effect of DRRSAb on PTZ-induced seizures in mice, we used two different protocols:

Protocol #1: as a measure of long-term seizure susceptibility two months after an episode of *status epilepticus* (SE), we assessed the latencies for the first myoclonic and

generalized tonic seizures induced by a low dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.).(Willis et al., 2010)
The effect of DRRSAb on seizure susceptibility in post-*SE* animals was investigated by administering the antibody (1 µg, intrahippocampal) or normal rabbit IgG 30 min before the injection of PTZ.

Protocol #2: the effect of DRRSAb on seizure activity induced by PTZ in naïve animals was investigated by administering the antibody (1 µg, intrahippocampal) or normal rabbit IgG 30 min before the injection of a fully convulsant dose of PTZ (60 mg/kg, i.p.).

We injected DRRSAb directly into the hippocampus because post-*SE* mice presents decreased Na⁺, K⁺-ATPase activity in this area (Funck et al., 2014). Doses and schedules for DRRSAb administration were chosen based on pilot experiments.

Pilocarpine-induced *SE*

The protocol for *SE* induction followed standard procedures (Upreti et al., 2012). Briefly, animals received a single methylscopolamine bromide injection (1 mg/kg in 0.9 % NaCl; i.p.) 30 min before the administration of pilocarpine to minimize peripheral cholinergic effects. A single injection of pilocarpine (320 mg/kg in 0.9 % NaCl; i.p.) elicited *SE*, which was defined as continuous limbic seizure activity characterized by head nodding and gnawing beginning after a generalized seizure. *SE* was terminated after 60 min with diazepam (20 mg/kg, i.p.). Controls animals received methylscopolamine and diazepam but received 0.9 % NaCl solution instead of pilocarpine. All mice were hand-fed with moistened chow and fresh fruits (apples and bananas) and injected with 5% dextrose in lactated Ringer's solution for three days following the *SE* or control procedure for animal welfare purposes.

Surgical procedures

Animals were anesthetized with i.p. ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two stainless steel screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire teflon-insulated depth electrodes (100 μ m) were implanted unilaterally into the hippocampus. For the intrahippocampal infusion of DRRSAb, a guide cannula (28 gauge) was glued to a multipin socket and inserted into the hippocampus coordinates from bregma, in mm: AP, -2.0; L, 1.8; and DV, 1.5 (Franklin and Paxinos, 2007). Mice received Meloxicam (2 mg/kg, subcutaneous) immediately before and for three days after the surgical procedure. The seizure experiments were performed 5-7 days after surgery.

Electroencephalography

Each mouse was transferred to a Plexiglas cage (25 X 25 X 40 cm) and habituated for 20 min before electroencephalographic (EEG) recordings. The animal was then connected to a 100x headstage pre-amplifier (model #8202-DSE3) in a low-torque swivel (Pinnacle Technology Inc, Lawrence, KS, USA) and the EEG was recorded using a PowerLab 16/30 data acquisition system (AD Instruments, Castle Hill, Australia). EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 1 kHz) and stored on a PC for off-line analysis. Routinely, a 30 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. Drug doses and time between injections were selected based on previous pilot experiments. Intrahippocampal 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. Thirty min thereafter the animals received the injection of PTZ and then were monitored for additional 15 min for the appearance of seizures. EEG recordings were visually analyzed for the appearance of seizure activity and the latency to the

first myoclonic seizure as well as the onset latency and duration of the first generalized tonic-clonic seizure were recorded, by combining electroencephalography and visual observation of behavior.

EEG analysis

Hippocampal EEG recordings were analyzed off-line using standard functions of LabChart 7.2 software (AD Instruments). Before the analysis, the EEG signal was classified as either theta rhythm or large-amplitude irregular activity (LIA). The theta rhythm functional state was defined as a sinusoidal-like waveform with a peak frequency of 3-8 Hz and a small bandwidth whereas the LIA functional state was defined as a large-amplitude irregular activity with a broad frequency band 0.5-25.0 Hz (Colom et al., 2006). Because hippocampal rhythms are largely impaired after SE (Dugladze et al., 2007), recordings made in post-SE animals were not included in the analysis. For quantitative analysis of the hippocampal EEG all noise-free theta or LIA sequences from the baseline and post intrahippocampal injection periods were divided into 4 s epochs. Individual epochs were averaged together according to their respective pattern (theta or LIA) and period (pre or post injection). EEG wave amplitude and the number of events with amplitude larger than two standard deviations from the mean (event count) were automatically calculated using the native LabChart functions Average cyclic height and Event count, respectively. The Spectrum toolbox of Labchart was used to compute EEG power in the selected frequency bands delta (0.5-3 Hz), theta (4-12 Hz), beta (13-30 Hz) and gamma (31-80 Hz). The digitized EEG data were segmented into 1024-point (50% overlap) and the signals were converted to power spectra by the native Labchart Fast Fourier Transform algorithm (Hann cosine-bell window). From each frequency band we obtained the maximum power values (maximum power), the frequency at which the maximum power occurs (maximum power frequency) and the relative contribution of each

frequency band to the sum of power at all frequencies (% of total power). Mice with artifact-prone EEG recordings (two injected with normal rabbit IgG and four injected with DRRSAb) were excluded from quantitative EEG analysis.

Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov test was used to verify data normality. Seizure latencies, generalized tonic-clonic seizure duration and Na^+ , K^+ -ATPase activity were analyzed by non-paired Student's t test. Only animals presenting the full spectrum of PTZ-induced seizures were included in the analysis of seizure latency. Data from quantitative EEG analysis was analyzed by paired (baseline versus injection) Student's t test. All tests were two-tailed and a probability of $P < 0.05$ was considered significant. P values are shown only when significant.

Results

Na^+ , K^+ -ATPase activating antiserum DRRSAb augments hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity in mice

Currently available data on Na^+ , K^+ -ATPase activation by DRRSAb come from studies in enzyme purified from outer medulla of rat or mouse kidney (Zheng et al., 2011). In this context, we tested whether DRRSAb would be able to increase Na^+ , K^+ -ATPase of mice hippocampus. We found that incubation with DRRSAb (1 μM) increased total Na^+ , K^+ -ATPase activity to 212 % [$t(6)=5.443$; $P<0.05$] (Figure 2A) and $\alpha 1$ Na^+ , K^+ -ATPase activity to 296 % [$t(6)=4.188$; $P<0.05$] (Figure 2B) but did not alter $\alpha 2/\alpha 3$ Na^+ , K^+ -ATPase activity (Figure 2C). On the other hand, a higher concentration of DRRSAb (3 μM) increased total [$t(10)=2.915$; $P<0.05$] (Figure 2A), $\alpha 1$ [$t(10)=2.238$; $P<0.05$] (Figure 2B) and $\alpha 2/\alpha 3$ [$t(10)=2.497$; $P<0.05$] (Figure 2C) Na^+ , K^+ -ATPase activities to 208, 213 and 203 % respectively.

DRRSAb attenuates seizure susceptibility in post-*SE* mice

Since Na^+ , K^+ -ATPase activity decreases after *SE* (Funck et al., 2014), we decided to test whether the Na^+ , K^+ -ATPase activator DRRSAb would reduce the increased long-term seizure susceptibility of post-*SE* mice (Blanco et al., 2009, Willis et al., 2010). We assessed the latency to the first generalized clonic and to the first generalized tonic-clonic seizure induced by a low dose of PTZ (30 mg/kg) 50-60 days after *SE*. We found that the intrahippocampal injection of DRRSAb delayed the onset of PTZ-induced myoclonic seizures in post-*SE* animals [$t(11)=2.555$; $P<0.05$] (Figure 3A). However, onset latency or duration of generalized seizures was not altered by DRRSAb (Figures 3B-C). EEG recordings confirmed that DRRSAb increased the latency to PTZ-induced myoclonic seizures (Figures 4A-D).

Effect of DRRSAb antibody on seizure susceptibility in naïve animals

Since we found an anticonvulsant effect of DRRSAb against the myoclonic seizures induced by a subeffective dose of PTZ (30 mg/kg) in post-*SE* animals, we subsequently investigated whether DRRSAb would be effective against the seizures induced by a fully convulsant dose of PTZ (60 mg/kg). These experimental paradigm using naïve animals have been widely used in the study of mechanisms of seizure generation, spreading, and termination, as well as development and screening of new compounds with anticonvulsant activity (White, 2006). Surprisingly, we found that the intrahippocampal injection of DRRSAb decreased the latency to PTZ-induced myoclonic [$t(14)=2.443$; $P<0.05$] (Figure 5A) and generalized [$t(14)=3.105$; $P<0.05$] (Figure 5B) seizures in naïve animals. Generalized seizure duration was not altered by DRRSAb (Figure 5C). Analysis of EEG recordings confirmed these findings (Figures 6A-D).

Effects of DRRSAb on hippocampal EEG recordings in mice

In order to shed some light on potential EEG changes underlying the modulation of seizures by the Na^+ , K^+ -ATPase activator DRRSAb, we performed a quantitative analysis of the hippocampal EEG recordings. We found no statistically significant changes in any of the computed parameters of the hippocampal theta pattern (data not shown). On the other hand, we detected slight differences regarding the hippocampal LIA pattern. Event count within LIA pattern decreased after DRRSAb injection [$t(4)=3.210$; $P<0.05$] (Figure 7A). Moreover, percentage of total power contributed by delta frequency band to LIA pattern increased [$t(4)=3.800$; $P<0.05$] (Figure 7B), whereas the maximum power frequency at delta frequency band shifted to smaller values after DRRSAb injection [$t(4)=3.314$; $P<0.05$] (Figure 7C). No statistically significant changes in any of the computed parameters were found in the hippocampal LIA pattern (data not shown). Representative EEG recordings and power spectra of DRRSAb-elicited changes in LIA functional state are shown in Figure 7D-F.

Discussion

Na^+ , K^+ -ATPase is a major regulator of brain excitability (Aperia, 2007, Benarroch, 2011). Accordingly, a decrease of Na^+ , K^+ -ATPase activity directly affects neural activity, neurotransmitter signaling as well as the whole animal behavior (Moseley et al., 2007). For instance, the Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor ouabain increases the frequency of spontaneous postsynaptic potentials and decreases the amplitude and duration of after hyperpolarization in the CA3 subfield of rabbit hippocampal slices (Haglund and Schwartzkroin, 1990). Moreover, dihydro-ouabain, a partial Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor, decreases the amplitude of GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in rat CA1 hippocampal neurons (Vaillend et al., 2002). In addition to pharmacological evidence, studies in mutant mice with impaired Na^+ , K^+ -ATPase have contributed to support the idea that a decrease in Na^+ , K^+ -ATPase increases brain

hyperexcitability. In this context, Clapcote and colleagues (2009) have identified a mutant mice (Myshkin, *Myk* mice) carrying a mutation (I810N) which renders the normally expressed Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 3$ isoform inactive. Hippocampal slices from *Myk* mice display enhanced excitation-spike coupling after theta burst stimulation, which indicates hyperexcitability after physiological patterns of high-frequency synaptic activity, and present reduced threshold for epileptiform activity elicited by bath superfusion with Mg^{2+} -free artificial cerebrospinal fluid (Clapcote et al., 2009). Importantly, *Myk* mice present complex partial and secondarily generalized spontaneous seizures, further evidencing that decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity is sufficient to render an epileptic phenotype.

In line with the view that decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity plays a causal role in seizure generation, it has been demonstrated that delivery of additional copies of wild-type Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 3$ subunit rescued Na^+ , K^+ -ATPase activity and prevented *in vitro* epileptiform activity and hyperexcitability in hippocampal slices from *Myk* mice (Clapcote et al., 2009). To some extent, our present results are in agreement with those obtained with *Myk* mice, since we found that activation of Na^+ , K^+ -ATPase with DRRSAb delayed the onset of PTZ-induced myoclonic seizures in post-*SE* animals. To the best of our knowledge, this is the first proof-of-principle that pharmacological activation of Na^+ , K^+ -ATPase alters seizures. Indeed, further studies are necessary to characterize the potential of this strategy as well its clinical implications.

Considering the anticonvulsant-like effects of DRRSAb against PTZ-induced myoclonic seizures in post-*SE* animals, the fact that DRRSAb facilitated the occurrence of PTZ-induced seizures in naïve animals may appear a conflicting finding. The occurrence of PTZ-induced myoclonic seizures in naïve animals has been classically attributed to activation of areas in the forebrain, primarily the thalamus, neocortex, and basal ganglia (Velíšková, 2006), whereas PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures represent the paroxysmal

activity spreading from the forebrain to the brainstem (Velišková, 2006). In this context, since the DRRSAb receptor (*i.e.* Na^+ , K^+ -ATPase isoforms) has a widespread expression in the above-mentioned areas, simultaneous modulation of myoclonic and generalized tonic-clonic seizures (as seen in naïve animals) seems possible. On the other hand, in post-*SE* animals the expression of Na^+ , K^+ -ATPase and many other receptors and ion channels change, and therefore protection against provoked seizures in the post-*SE* sensitized animals may require the modulation of additional targets. In what regards Na^+ , K^+ -ATPase, one possible explanation is that a dysregulation in Na^+ , K^+ -ATPase activity, regardless of the direction, contributes to seizure onset. In other words, it is possible that fine-tuning of brain excitability by Na^+ , K^+ -ATPase activity is better accomplished when the enzyme activity is within a given optimal range. In this context, activation of Na^+ , K^+ -ATPase with DRRSAb facilitates the occurrence of seizures in naïve animals (where enzyme activity is within the normal range), whereas it delays the seizures in post-*SE* animals (where Na^+ , K^+ -ATPase is decreased). This line of view is corroborated by findings using *in vitro* electrophysiology and computational modeling. In fact, Krishnan and colleagues (2015) have shown that the activation of Na^+ , K^+ -ATPase by increased intracellular sodium during epileptiform activity mediates the hyperpolarizing current that contributes to termination of seizure, and that reduction of enzyme activity with strophanthidin triggered epileptiform events. Moreover, Gullledge and colleagues (2013) have demonstrated that at near-physiological temperatures, the activity-dependent activation of Na^+ , K^+ -ATPase generates prolonged after hyperpolarization periods of action potential generation in mice neocortical and hippocampal pyramidal neurons, indicating that Na^+ , K^+ -ATPase, rather than potassium conductances, is the primary contributor to the after hyperpolarization (Gullledge et al., 2013). In this context, it is interesting to note that a gain-of-function in large conductance calcium-activated potassium channels, which also are pivotal for plasma membrane repolarization after action potentials,

renders an epileptic phenotype in humans (Du et al., 2005) and mice (Brenner et al., 2005). Indeed, future studies will be important to investigate the idea that abnormally increased Na^+ , K^+ -ATPase activity may support epileptiform higher firing rates in a similar manner as seen for BK channels.

Alternative explanations to the pro-convulsant effect of Na^+ , K^+ -ATPase activation beyond the optimal range in naïve animals can be derived from studies about the role of this enzyme in calcium signaling. For instance, inhibition or activation of Na^+ , K^+ -ATPase increases intracellular calcium concentration. Accordingly, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase by ouabain causes intracellular calcium overload in mice hippocampal slices by reducing Na^+ extrusion, which provides more Na^+ to exchange for Ca^{2+} through reversal of the Na^+ , Ca^{2+} exchanger (Dietz et al., 2007). On the other hand, activation of Na^+ , K^+ -ATPase with DRRSAb increases intracellular Ca^{2+} in isolated rat cardiac myocytes through L-type channels and Src and extracellular-regulated kinase-1/2 (ERK-1/2) signaling (Zheng et al. 2011). At the present is not clear whether this functional coupling between Na^+ , K^+ -ATPase and L-type Ca^{2+} channels also take a place in neurons, but it worth mentioning that bath application of Bay-K8644, a L-type Ca^{2+} channel agonist, enhances excitatory postsynaptic potentials in hippocampal neurons in culture, resulting in paroxysmal depolarization shifts (Rubi *et al.* 2013). In addition, it has demonstrated that ERK-1/2 signaling is an important predisposing factor for seizure activity (Nateri et al., 2007; Glazova et al., 2015). In fact, transgenic mice overexpressing a constitutively active form MEK kinase 1 in the brain displays spontaneous seizures (Nateri et al., 2007). Moreover, pharmacological inhibition of ERK1/2 activity by SL-327 prevents audiogenic seizure behavior in rats (Glazova et al., 2015), further supporting the critical role of ERK-1/2 in seizure activity. Given that DRRSAb causes ERK-1/2 activation (Zheng et al. 2011), it is possible that at least part of the pro-convulsant action of DRRSAb in naïve animals relies on its effect on ERK-1/2 signaling.

Regarding the changes in the power spectrum of hippocampal LIA pattern, it is interesting that increases in the delta frequency have been found in hippocampal EEG in conditions associated with hyperexcitability. For instance, the relative delta power greatly increased after the ischemic episode induced by bilateral common carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats and their respective normotensive controls (Mariucci et al., 2003). The same study has shown that hippocampal delta activity was positively correlated with the degree of neuronal necrosis and astrocytic activation following ischemia (Mariucci et al., 2003). In addition, Vorobyov and colleagues (2011) have shown that a single intracerebroventricular injection of the excitatory amino acid N-methyl-D-aspartate increases the relative delta power in the rat hippocampal EEG. Altogether, these findings concur to the above discussion that activation of Na^+ , K^+ -ATPase in naïve animals increase brain excitability, but further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms and whether these changes may also explain the increased seizure susceptibility.

In summary, in the present study we showed that activation of Na^+ , K^+ -ATPase with intrahippocampal injection of specific antibody raised against the α subunit decreased the susceptibility of post-*SE* animals to PTZ-induced myoclonic seizures. In contrast, DRRSAb facilitated the appearance of PTZ-induced seizures in naïve animals. Further studies are necessary to define the potential of Na^+ , K^+ -ATPase activation as a new therapeutic approach for seizure disorders.

Acknowledgements

Work supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (ARD 11/1630-1, PRONEM 11/2082-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (471666/2013-0). The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to V.R.F., L.R.R., C.V.O., I.D.D.P.), CNPq/Pibic (to L.M.P.) and Fapergs/Probic (to J.G). M.R.F., L.F.F.R, A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. Helpful discussions were provided by Dr. Casey Chan, Susan C. Wright and Andrew Mendelsohn. The authors also thank Dr. Carlos Fernando Mello for kindly providing laboratory facilities and valuable comments.

References

- Aperia A (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 261:44-52.
- Benarroch EE (2011) Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76:287-293.
- Blanco MM, dos Santos JG, Jr., Perez-Mendes P, Kohek SR, Cavarsan CF, Hummel M, Albuquerque C, Mello LE (2009) Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylentetrazole and electroshock models. *Epilepsia* 50:824-831.
- Brenner R, Chen QH, Vilaythong A, Toney GM, Noebels JL, Aldrich RW (2005) BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci* 8:1752-1759.
- Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Rodacker Schack V, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Minassian BA, Ackerley CA, Sled JG, Cortez MA, Henderson JT, Vilsen B, Roder JC (2009) Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14085-14090.
- Colom LV, Garcia-Hernandez A, Castaneda MT, Perez-Cordova MG, Garrido-Sanabria ER (2006) Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *J Neurophysiol* 95:3645-3653.
- de Lores Arnaiz GR, Ordieres MG (2014) Brain Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10:85-102.
- Deprez L, Weckhuysen S, Peeters K, Deconinck T, Claeys KG, Claes LR, Suls A, Van Dyck T, Palmi A, Matthijs G, Van Paesschen W, De Jonghe P (2008) Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. *Epilepsia* 49:500-508.

- Dietz RM, Kiedrowski L, Shuttleworth CW. (2007) Contribution of Na(+)/Ca(2+) exchange to excessive Ca(2+) loading in dendrites and somata of CA1 neurons in acute slice. *Hippocampus* 17:1049-1059.
- Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Luders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK (2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* 37:733-738.
- Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ, Gloveli T (2007) Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17530-17535.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475-482.
- Franklin KB and Paxinos G (2007) *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*.
- Funck VR RL, Pereira LM, Oliveira CV, Grigoletto J, Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS (2014) Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108:1705-1710.
- Glazova MV, Nikitina LS, Hudik KA, Kirillova OD, Dorofeeva NA, Korotkov AA, Chernigovskaya EV (2015) Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *J Neurochem* 132:218-229.
- Grisar T, Delgado-Escueta AV (1986) Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K⁺ activation of Na⁺,K⁺-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. *Brain Res* 364:1-11.

- Gritz SM, Radcliffe RA (2013) Genetic effects of ATP1A2 in familial hemiplegic migraine type II and animal models. *Hum Genomics* 7:8.
- Gulledge AT, Dasari S, Onoue K, Stephens EK, Hasse JM, Avesar D (2013) A sodium-pump-mediated afterhyperpolarization in pyramidal neurons. *J Neurosci* 33:13025-13041.
- Haglund MM, Schwartzkroin PA (1990) Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. *J Neurophysiol* 63:225-239.
- Heinzen EL, Arzimanoglou A, Brashear A, Clapcote SJ, Gurrieri F, Goldstein DB, Jóhannesson SH, Mikati MA, Neville B, Nicole S, Ozelius LJ, Poulsen H, Schyns T, Sweadner KJ, van den Maagdenberg A, Vilsen B; ATP1A3 Working Group. (2014) Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol* 13:503-514.
- Krishnan GP, Filatov G, Shilnikov A, Bazhenov M (2015) Electrogenic properties of the Na⁺/K⁺ ATPase controls transitions between normal and pathological brain states. *J Neurophysiol* in press (doi: 10.1152/jn.00460.2014).
- Mariucci G, Stasi MA, Taurelli R, Nardo P, Tantucci M, Pacifici L, Carminati P, Ambrosini MV (2003) EEG power spectra changes and forebrain ischemia in rats. *Can J Neurol Sci* 30:54-60.
- Marquezan BP, Funck VR, Oliveira CV, Pereira LM, Araujo SM, Zarzecki MS, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS (2013) Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy Res* 105:396-400.
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616-626.

- Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, Makwana M, Brandner S, Adams RH, Jefferys JG, Kann O, Behrens A (2007) ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J* 26:4891-4901.
- Nishi A, Fisone G, Snyder GL, Dulubova I, Aperia A, Nairn AC, Greengard P (1999) Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem* 73:1492-1501.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416-426.
- Poulsen H, Khandelia H, Morth JP, Bublitz M, Mouritsen OG, Egebjerg J, Nissen P (2010) Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *Nature* 467:99-102.
- Rapport RL, 2nd, Harris AB, Friel PN, Ojemann GA (1975) Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch Neurol* 32:549-554.
- Rubi L, Schandl U, Lagler M, Geier P, Spies D, Gupta KD, Boehm S, Kubista H (2013) Raised activity of L-type calcium channels renders neurons prone to form paroxysmal depolarization shifts. *Neuromolecular Med* 15:476-492.
- Schmidt D, Sillanpaa M (2012) Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 25:159-163.
- Schneider Oliveira M, Flavia Furian A, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, de Carvalho Myskiw J, Gindri Fiorenza N, Mello CF (2004) Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728.
- Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jette N, Williams J, Wiebe S (2007) Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 48:2336-2344.

- Upreti C, Otero R, Partida C, Skinner F, Thakker R, Pacheco LF, Zhou ZY, Maglakelidze G, Velíšková J, Velíšek L, Romanovicz D, Jones T, Stanton PK, Garrido-Sanabria ER (2012) Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 135:869-885.
- Vaillend C, Mason SE, Cuttle MF, Alger BE (2002) Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J Neurophysiol* 88:2963-2978.
- Velíšková J (2006) Chapter 48 - Behavioral Characterization of Seizures in Rats. *Models of Seizures and Epilepsy*.
- Vorobyov V, Schibaev N, Kaptsov V, Kovalev G, Sengpiel F (2011) Cortical and hippocampal EEG effects of neurotransmitter agonists in spontaneously hypertensive vs. kainate-treated rats. *Brain Res* 1383:154-168.
- White HS S-YM, Srivastava A, Wilcox KS. (2006) Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé S (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy*. Burlington, MA.
- Willis S, Stoll J, Sweetman L, Borges K (2010) Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. *Neurobiol Dis* 40:565-572.
- WHO (2006) World Health Organization Neurological disorders: Public health challenges. Geneva, Switzerland.
- Xu KY (2005) Activation of (Na⁺K⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1669-1677.
- Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS (2011) Cardioprotection induced by Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res* 89:51-59.

Figures

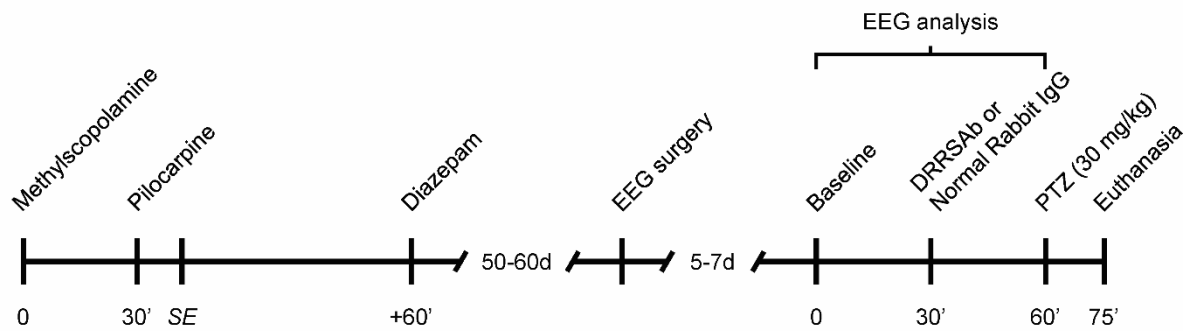
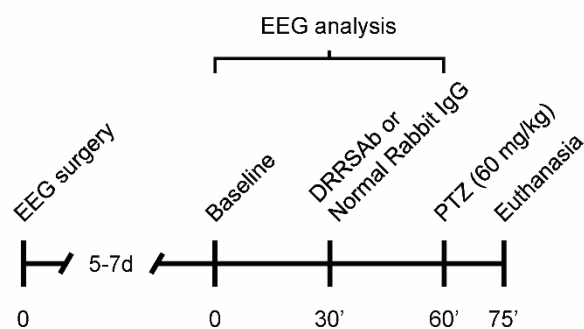
A**B**

Figure 1: Experimental designs used in the present study. (A) Protocol #1 and (B) Protocol #2.

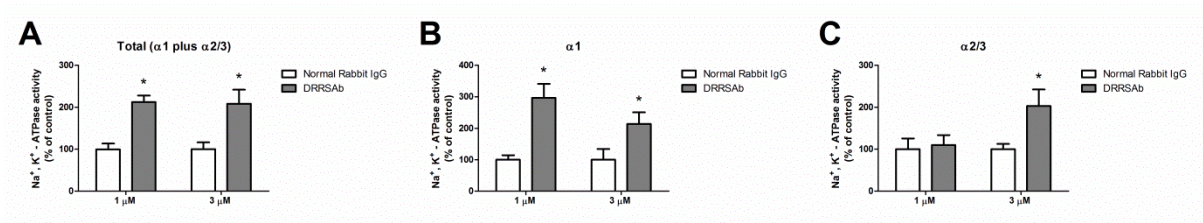


Figure 2: DRRSAb augments $\alpha 1$ but not $\alpha 2/3$ hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity *in vitro*. In this set of experiments (A) total (B) $\alpha 1$ or (C) $\alpha 2/3$ Na^+ , K^+ -ATPase activities were measured following incubation of hippocampal homogenates with DRRSAb (1 μM) for 30 minutes. Data are presented as mean+SEM for $n=5$ in each group, from three different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective control group.

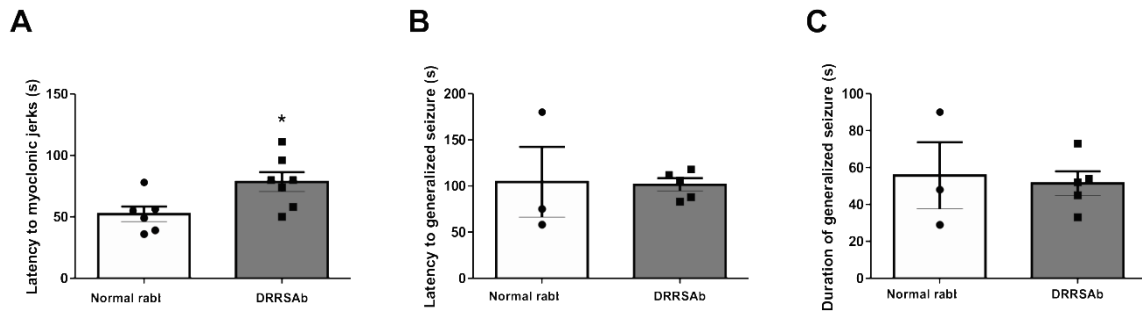


Figure 3: Analysis of PTZ-induced seizure activity in normal rabbit IgG- or DRRSAb-injected mice 60 days after pilocarpine-induced *SE*. In this set of experiments the latency to (A) myoclonic jerks or (B) generalized tonic-clonic seizures as well as the (C) duration of generalized seizures induced by a low dose of PTZ (30 mg/kg) were measured after the intrahippocampal injection of control IgG or DRRSAb. Data are presented as mean \pm SEM for n=6-7 (myoclonic seizures) or 3-5 (generalized seizures) each group, from two different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$).

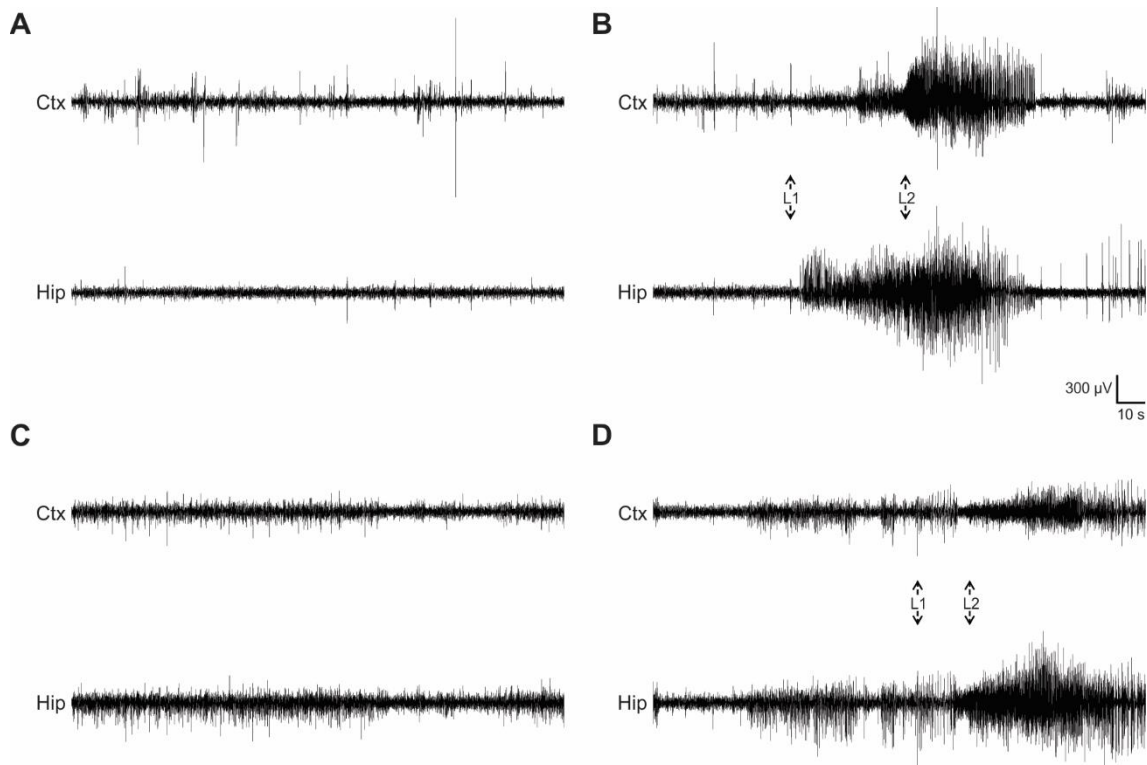


Figure 4: Typical seizure sequences observed in cerebral cortex (Ctx) or hippocampus (Hip) after administration of PTZ in post-*SE* animals injected with normal rabbit IgG (A, baseline; B, post PTZ) or DRRSAb (C, baseline; D, post PTZ). Post PTZ traces start immediately after PTZ injection. L1, latency to myoclonic seizure; L2, latency to generalized tonic-clonic seizure.

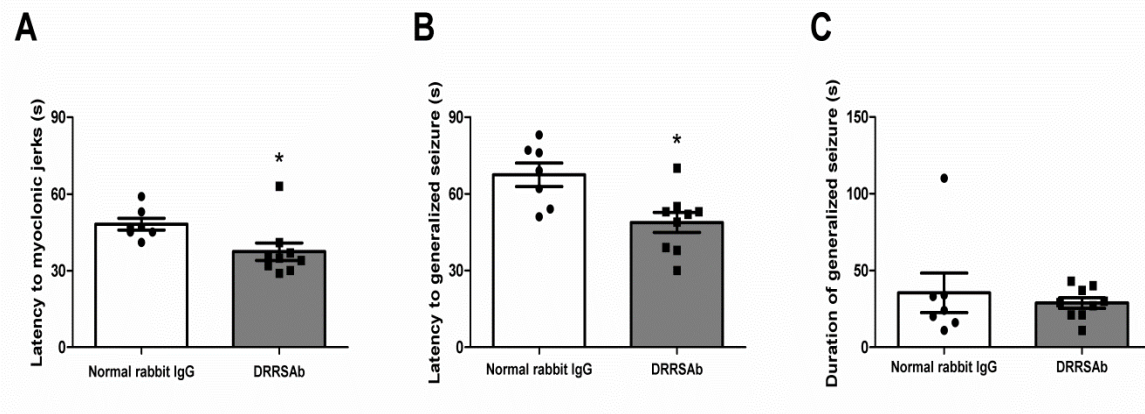


Figure 5: Analysis of PTZ-induced seizure activity in normal rabbit IgG- or DRRSAb-injected naïve mice. In this set of experiments the latency to (A) myoclonic jerks or (B) generalized tonic-clonic seizures as well as the (C) duration of generalized seizures induced by a fully convulsant dose of PTZ (60 mg/kg) were measured after the intrahippocampal injection of control IgG or DRRSAb. Data are presented as mean ± SEM for n=7-9 each group, from three different experiments. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$).

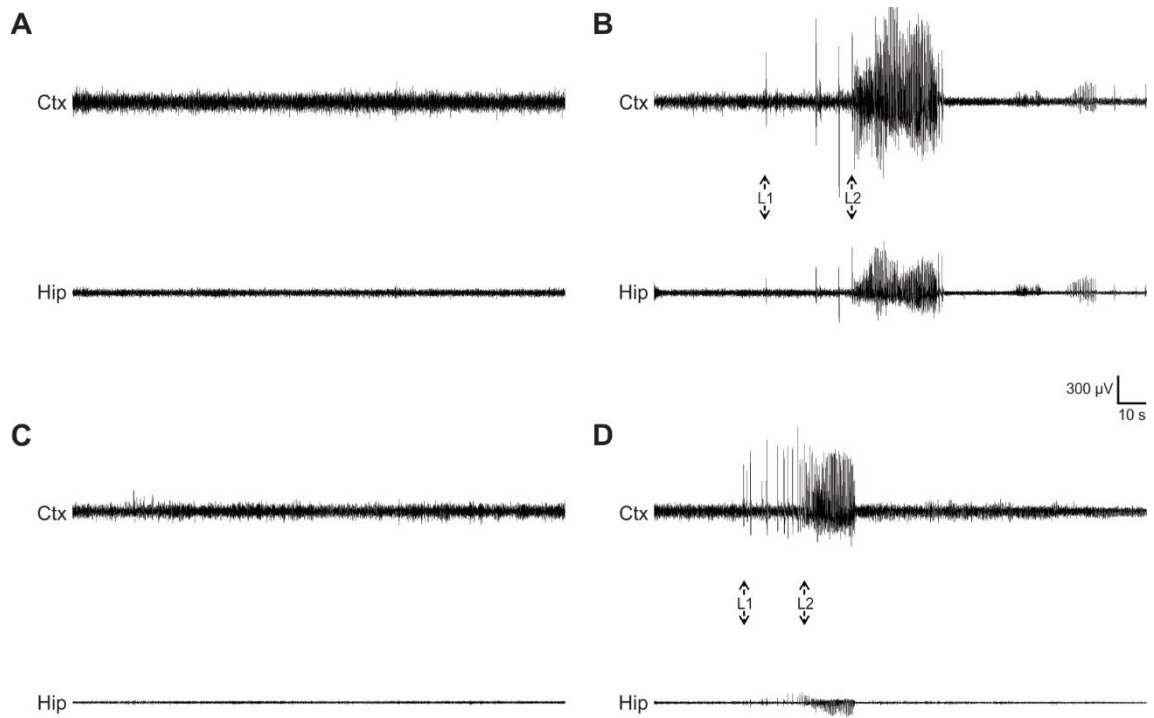


Figure 6: Typical seizure sequences observed in cerebral cortex (Ctx) or hippocampus (Hip) after administration of PTZ in naïve animals injected with normal rabbit IgG (A, baseline; B, post PTZ) or DRRSAb (C, baseline; D, post PTZ). Post PTZ traces start immediately after PTZ injection. L1, latency to myoclonic seizure; L2, latency to generalized tonic-clonic seizure.

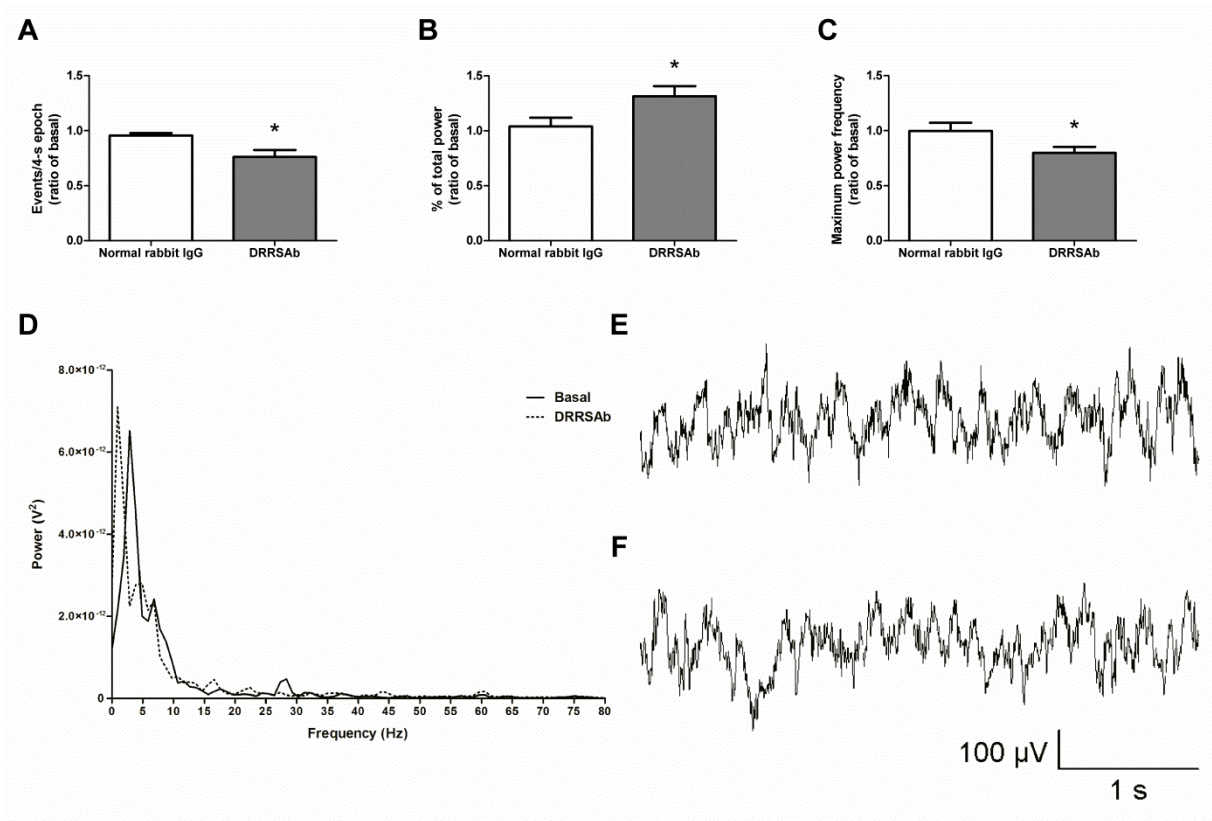


Figure 7: Quantitative analysis of hippocampal EEG from naïve mice during LIA pattern. (A) Number of events, (B) percentage of total power contributed by the delta band and (C) maximum power frequency for the delta band. It is also shown a representative power spectrum (D) computed from LIA sequences observed in the hippocampus of naïve mice before (E) and after (F) administration of DRRSAb (1 μ g).

6. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Resultados produzidos durante o período sanduiche nos Estados Unidos.



Presentation Abstract

Session: Poster Session 7 (G)
Saturday, Nov 15, 2014, 11:00 AM -12:15 PM

Presentation Title: G067 - Chronic Treatment with Levetiracetam has a Reduction in Abnormally Augmented Presynaptic Vesicular Release after Pilocarpine-induced Status Epilepticus

Location: Neuroscience

Scientific Discipline: + 10. Neuroscience -> b. Neuroscience

Education Level: Undergraduate Senior

Author(s): **Nuri N. Ruvalcaba**; Luis F. Pacheco, Ph.D.; Vinicius Funck, M.S.; and Emilio R. Garrido-Sanabria, M.D./Ph.D.
University of Texas at Brownsville, Brownsville, TX

Abstract: Epilepsy is a neurological disorder affecting 2% of the population worldwide. Levetiracetam (LEV) is a new anti-epileptic drug that binds to a presynaptic vesicular protein, Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A); however, the mechanism of action remains unknown. Abnormal presynaptic release of glutamate has been considered one of the seizure-induced alterations in epilepsy. Previous studies have shown abnormally enhanced vesicular releases in hippocampal presynaptic boutons during epileptic seizures. Here, we investigated if chronic treatment with LEV will modify abnormal presynaptic releases induced by status epilepticus. Control and epileptic mice were treated with LEV (experimental, n=7) or saline solution (control, n=6). To induce chronic epilepsy, the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy was developed in synaptophysin (SpH) transgenic mice. Imaging of electrically-evoked release was performed by confocal imaging in brain slices. Time-lapsed images were obtained from the CA3 stratum lucidum in hippocampus. For this analysis, we included 92 synaptic boutons from 7 slices in the control non-treated group, 148 boutons from 12 slices in control (treated with LEV), 115 boutons from 7 slices in epileptic (non-treated group) and 100 boutons from 6 slices in epileptic group chronically treated with LEV. As previously reported, in this study we observed that non-treated epileptic SpH mice exhibited an increase in vesicular release when compared to the non-treated control group. In contrast, LEV-treated SpH epileptic mice exhibited a reduction in release when compared to control animals treated with LEV. From this study we concluded that LEV inhibited enhanced vesicular release in epileptic mice, indicating that the anti-epileptic action may be mediated by changes in the vesicular release machinery.

Funding: DOD grant # PR100534 and # PR100534P1

Program Director: Michael Lehker Ph.D. University of Texas at Brownsville

Chronic treatment with levetiracetam has a reduction in abnormally augmented presynaptic vesicular release after pilocarpine-induced status epilepticus

Nuri Ruvalcaba, Dr. Luis F. Pacheco, Ph.D., Vinicius Funck MD., Dr. Emilio R. Garrido-Sanabria, Department of Biomedicine, University of Texas at Brownsville, Brownsville, TX, USA



Contact Information:
Emilio Garrido-Sanabria
Department of Biomedicine
University of Texas at Brownsville
80 First Brown, BSIB 1.120,
Brownsville, TX 77805
Tel: (936) 882-5053; Fax (936) 882-5943

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder affecting 2% of the population worldwide. Levetiracetam (LEV) is a new anti-epileptic drug that binds to a presynaptic vesicular protein. Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A). However, the mechanism of action remains unknown. Abnormal presynaptic release of glutamate has been considered one of the seizure-induced alterations in epilepsy. Previous studies have shown abnormally augmented presynaptic vesicular release induced by status epilepticus. Control and epileptic mice were treated with LEV (experimental, n=7) or saline solution (control, n=6). To reduce chronic epilepsy, the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy was developed in synaptophysin knock-out mice (SynKO) (n=7). In this study, we used confocal microscopy to visualize the presynaptic vesicles in the CA3 region of hippocampus. For this analysis, we included 92 synaptic boutons from 7 slices in the control non-treated group, 148 boutons from 12 slices in control (treated with LEV), 115 boutons from 7 slices in epileptic (non-treated group) and 100 boutons from 8 slices in epileptic group chronically treated with LEV. As previously reported, in this study we observed a normal number of synaptic vesicles in the CA3 region of hippocampus in control mice. However, we observed a significant increase in the number of synaptic vesicles in epileptic mice exhibiting a reduction in release when compared to control animals treated with LEV. From this study we concluded that LEV inhibited augmented vesicular release in epileptic mice, indicating that the anti-epileptic action may be mediated by changes in the vesicular release machinery.

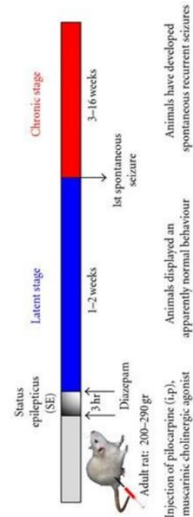
INTRODUCTION

Epilepsy is a neurological disorder that affects the nervous system and is also considered a seizure disorder. A person is diagnosed with epilepsy when they have at least two unprovoked seizures. The most common type of epilepsy is focal epilepsy. The most common type of focal epilepsy is temporal lobe epilepsy (TLE). Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of focal epilepsy. It is characterized by recurrent seizures that originate in the temporal lobe. The most common type of TLE is mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). MTLE is characterized by recurrent seizures that originate in the mesial temporal lobe. The most common type of MTLE is hippocampal sclerosis (HS). HS is a structural abnormality of the hippocampus that is characterized by neuronal loss and gliosis. The most common type of HS is hippocampal sclerosis (HS). HS is a structural abnormality of the hippocampus that is characterized by neuronal loss and gliosis. The most common type of HS is hippocampal sclerosis (HS).

METHODS

- Pilocarpine model of status epilepticus (SE). Adult mice were 24 of age (24-26 g body weight, 6-16 weeks of age, 6-16 weeks of age). They were administered a 30 mg/kg of pilocarpine to maintain systemic state effects. Animals were then injected with the pilocarpine (30 mg/kg) (Sigma-Aldrich) in saline (p.i). We used a minimum dose of 30 mg/kg of pilocarpine to induce SE. Animals were then injected with the pilocarpine (30 mg/kg) (Sigma-Aldrich) in saline (p.i). We used a minimum dose of 30 mg/kg of pilocarpine to induce SE. Animals were then injected with the pilocarpine (30 mg/kg) (Sigma-Aldrich) in saline (p.i). We used a minimum dose of 30 mg/kg of pilocarpine to induce SE.
- Levetiracetam (Keppra) injections. SpH mice were injected in the abdomen with 2ul of either placebo (saline solution) or Levetiracetam (Keppra, LEV) based on their mass. Injections continued every other day for 1 month, and then switched under the sedation drug, lorazepam.
- Confocal microscopy. Confocal microscopy was used to visualize the electrically-evoked (600 pulse/20 Hz) for stimulus (mossy fiber) boutons. Time-lapse images were obtained from the CA3 stratum radiatum in the hippocampus (diagram 1).

Diagram 1: Pilocarpine Model of SpH Mice



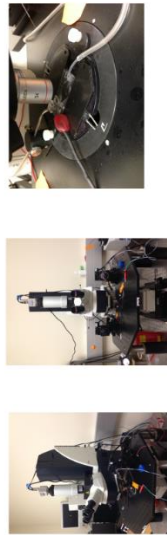
Pilocarpine model: a model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in adult rat

Diagram 2: Brain Slice Preparation



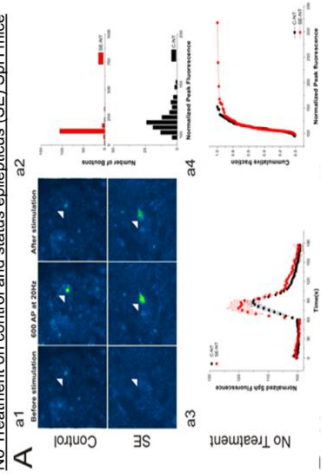
Leica TV 1200S Vibrating Microtome used in brain slicing

Diagram 3: Confocal Microscopy



RESULTS

No Treatment on control and status epilepticus (SE) SpH mice



Leica STP6000 used in imaging of brain slices

Figure 1: Time-confocal images from control and SE SpH-expressing MFBs in the CA3 region with No treatment. Solid arrows indicate puncta that showed activity-dependent fluorescence changes during a 600 pulse/20 Hz stimulus train. Fluorescence intensity of individual boutons from a control (black circles) and a post-status epilepticus (red circles) slice in response to the 600 pulse/20 Hz mossy fiber stimulation.

Levetiracetam (LEV) on control and status epilepticus (SE) SpH mice

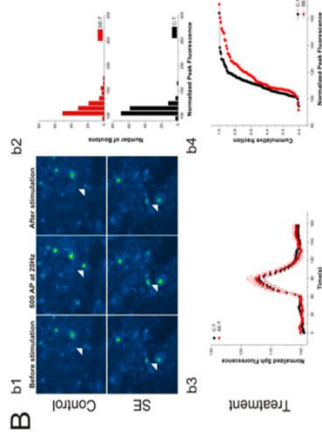


Figure 2: Time-confocal images from control and SE SpH-expressing MFBs in the CA3 region with LEV treatment. Solid arrows indicate puncta that showed activity-dependent fluorescence changes during a 600 pulse/20 Hz stimulus train. Fluorescence intensity of individual boutons from a control (black circles) and a post-status epilepticus (red circles) slice in response to the 600 pulse/20 Hz mossy fiber stimulation.

CONCLUSION

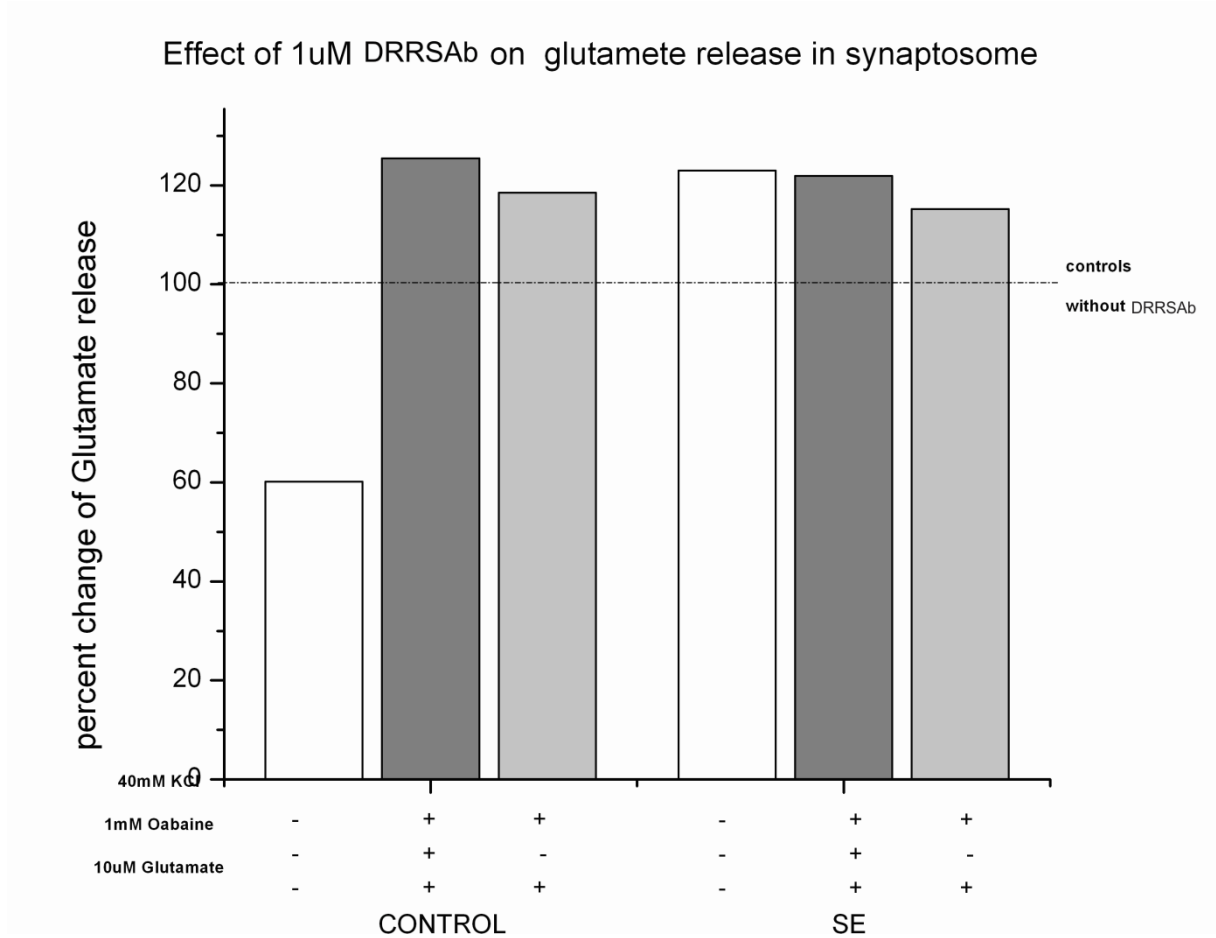
In conclusion, Levetiracetam significantly reduced the abnormal presynaptic release induced in status epilepticus SpH mice. This was seen by comparing both the control and the epileptic mice with and without treatment. It is an indicator that the way LEV works is by modulating changes in the vesicular release machinery. Further studies will be necessary in order for us to confirm the results that we obtained in these set of experiments.

REFERENCES

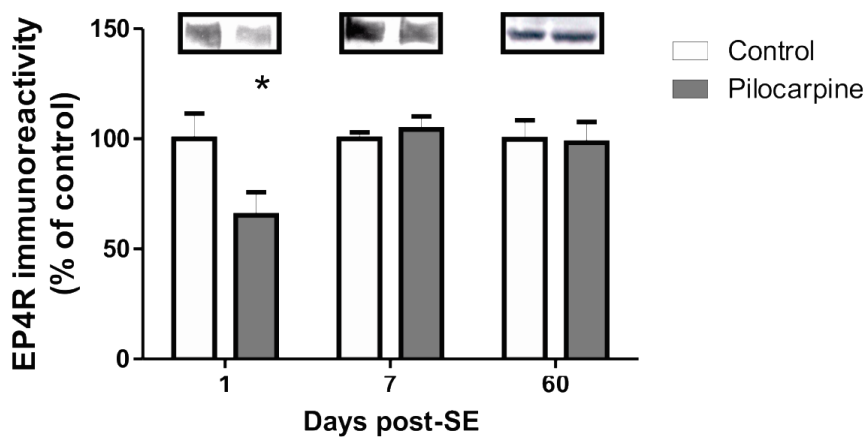
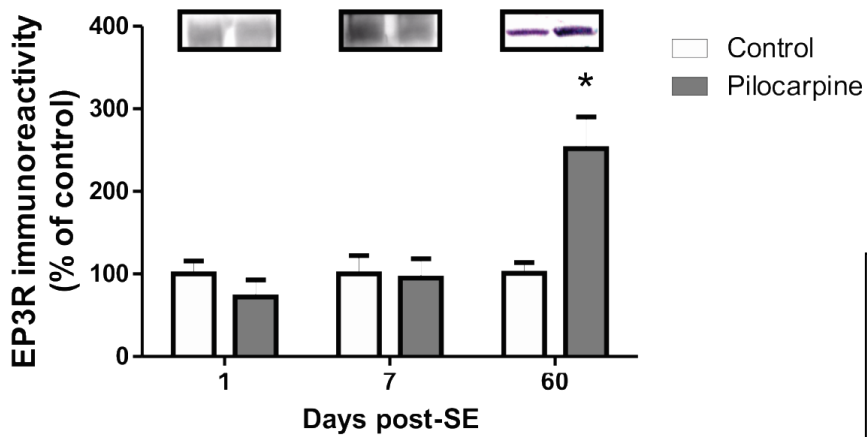
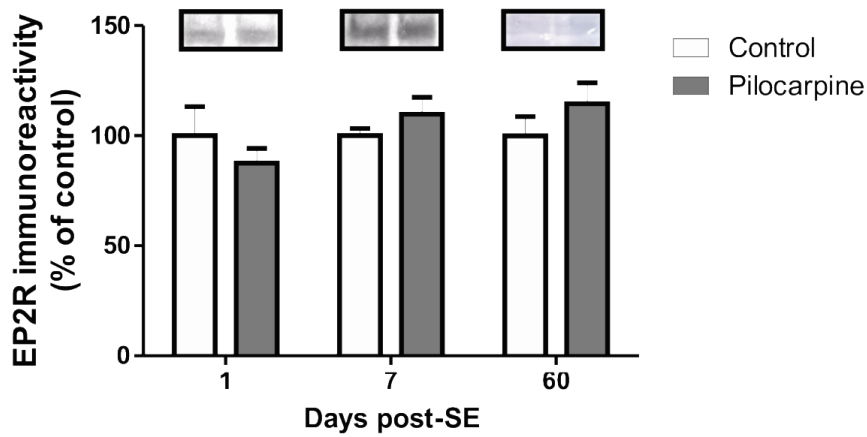
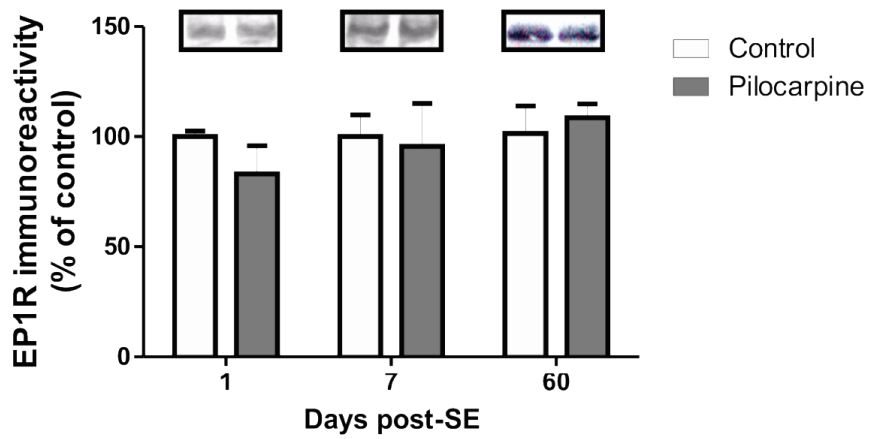
- Upreti, C. et al., (2012). Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain J. Journal of Neurology* 135: 869-885.
- Fisher, S. R. et al., (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(5): 716-722.

ACKNOWLEDGEMENTS

This Study was Supported by NIH grants GM81109 and NS060350, DAD grant PR100531 to ERGS, NINDS grant NS041421 and DAD grant PR050519 to PKC, and The Alamy Biomedical Research Support Research Initiative for Scientific Enhancement Program at UTH (Grant #13010001) to PKC. We thank Dr. Richard Isaacson for his guidance and for giving me the opportunity of working in this project. Thank you to all my lab for their encouragement, help and patience.



Effect of 1 μ M of DRRSAb on glutamate release in synaptosome from hippocampus of naïve and post-SE rats.



The immunocontent of EP1R, EP2R, EP3R and EP4R were measured at 24h, 7 days or two months after pilocarpine-induced SE. Data are presented as mean+SEM for n=4 in each group. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the respective age-matched control group (Student's t test).

7. DISCUSSÃO

A relevância dos estudos para o tratamento e melhora da qualidade de vida das pessoas que possuem epilepsia e as suas comorbidades, já foram bem esclarecidas nos capítulos anteriores, reforçam a necessidade de estudos em modelos animais que possam reproduzir de forma fidedigna essa doença, para que se possam buscar meios para o seu tratamento, desvendar mecanismos e descobrir novos alvos para a ação drogas.

A partir de estudos anteriores do grupo, foi mostrado que as crises caudas por PTZ diminuam a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e isso tinha uma correlação com a latência para o início e generalização das crises (Marquezan, Funck et al. 2013). Esse achado chamou a atenção para o estudo da Na^+ , K^+ -ATPase no modelo de epilepsia do lobo temporal mesial com a pilocarpina, pois esse é um modelo animal de epilepsia que causa uma série de alterações neurofisiológicas no animal ao longo do tempo que leva a crises espontâneas e recorrentes, muito diferente do que foi visto no trabalho anterior, no qual a crise era induzida de forma aguda.

Com isso, o estudo aqui apresentado começou a ser desenvolvido para avaliar a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no modelo da pilocarpina em camundongos, observou-se que a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase está diminuída no hipocampo de camundongos epiléticos (60 dias após - SE), mas isso não está relacionado com a fosforilação no resíduo de Serina 943, diferentemente do que aconteceu no estudo anterior com PTZ (Marquezan, Funck et al. 2013). Assim, buscou-se saber o motivo pelo qual a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase está diminuída, sabendo que a modificação pós-translacional irreversível, como a nitração é normalmente associada com perda permanente da função (Dalle-Donne, Rossi et al. 2006) e que a nitração de proteínas totais (tal como medida dos níveis 3-NT) é progressivamente aumentada em neurônios do hipocampo de ratos após seis semanas após SE induzido por ácido caínico. Através de uma técnica de imunoprecipitação da Na^+ , K^+ -ATPase do hipocampo de camundongos mediu-se os marcadores de estresse oxidativo 3-NT, HNE e a carbonilação de proteínas, resultando em um aumento da nitração da Na^+ , K^+ -ATPase, mas sem alteração nos marcadores de peroxidação lipídica e carbonilação proteica (Artigo, figura 4).

Com isso, veio à questão se essa nitração seria a causa ou a consequência no animal após SE, considerando que ocorreu um aumento na constante de Michaelis-Menten para concentração de ATP, principal substrato da Na⁺, K⁺-ATPase, mais relacionado a isoforma α 2/3 da Na⁺, K⁺-ATPase sugerindo uma diminuição da afinidade pelo ATP em camundongos epiléticos, isso poderia agravar uma disfunção no metabolismo energético mitocondrial. O que já foi mostrado em hipocampo de camundongos na fase crônica da epilepsia do lobo temporal (Smeland, Hadera et al. 2013). Mas ao invés de insistir em descobrir o mecanismo pelo qual ocorreram essas alterações via estresse oxidativo, buscou-se de algo que pudesse interferir na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, pois o controle da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase poderia ser relevante para reverter as alterações nos camundongos epiléticos.

Descobriu-se, então, um anticorpo denominado SSA412, que se liga a uma região específica da Na⁺, K⁺-ATPase, aumentando a atividade da enzima em cardiomiócitos (Xu 2005; Xu, Takimoto et al. 2006; Lee, Klein et al. 2009). No primeiro momento tentou-se o contato com Dr^a. Xu, a qual tem o primeiro artigo publicado com SSA412, mas não se obteve sucesso. Logo após fez-se o contato com Dr. James W. Larrick um dos autores do artigo intitulado *Cardioprotection induced by Na(+)/K(+)-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway*. Neste, o anticorpo também é específico para uma região D – R da Na⁺,K⁺-ATPase e produz efeitos cardioprotetores (Zheng, Koh et al. 2011), sendo reconhecido como DRRSAb. Dr. Larrick após conhecer o objetivo do presente estudo aqui desenvolvido, enviou prontamente o anticorpo para que pudesse ser feito o teste no modelo da pilocarpina.

A partir disso testou-se o DRRSAb nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1 μ M, um aumento da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase total e α 1, considerando que o objetivo seria fazer uma injeção intrahipocampal a concentração de 1 μ M poderia ser administrada em volume necessário para esse tipo de experimento. Curiosamente houve mudança na isoforma α 2/3, um dos motivos seria pela maior afinidade do anticorpo DRRSAb pela isoforma α 1 (Zheng, Koh et al. 2011), isso foi comprovado com experimentos posteriores utilizando uma concentração de 3 μ M de DRRSAb, ocorrendo o aumento da atividade nas isoformas α 1 e α 2/3 (manuscrito, figura 1).

Assim, testou-se a ativação da Na^+ , K^+ -ATPase, com uma injeção intrahipocampal do DRRSAb resultando na diminuição da susceptibilidade para crises mioclônicas induzida por PTZ nos animais epiléticos. Por outro lado, a administração de DRRSAb no hipocampo de animais controle facilitou o aparecimento de convulsões induzidas por PTZ. Confirmando que o aumento da atividade induzida pelo DRRSAb pode reduzir a susceptibilidade para as crises em animais epiléticos. Contudo o aumento da atividade não é benéfico em animais não epiléticos, por causar a crise mais rapidamente, provavelmente por alterar o estado de funcionamento basal da Na^+ , K^+ -ATPase e conseqüentemente aumentando a excitabilidade causado por um possível alteração da função dos transportadores de glutamato/ Na^+ , K^+ -ATPase aumentando a concentração de glutamato na fenda (manuscrito, figuras 3 a 6). Pode-se concluir que um aumento da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em uma estrutura como o hipocampo de animais epiléticos onde já foi mostrado que a atividade da enzima está diminuída (Artigo, figura 1), pode ocorrer por uma diminuição da excitabilidade e conseqüente diminuição da susceptibilidade ao PTZ, podendo ser explicado pelo acoplamento dos transportadores de glutamato/ Na^+ , K^+ -ATPase, quando a Na^+ , K^+ -ATPase está ativa e aumenta as concentrações de Na^+ favorece a captação de glutamato da fenda sináptica diminuindo a excitotoxicidade causa pelo excesso de glutamato (Zhang, Sun et al. 2015).

A Eletroencefalografia (EEG) é o registro da atividade elétrica do encéfalo. Consiste em medida das flutuações de voltagem resultantes da corrente iônica dentro dos neurônios gerando uma série de impulsos elétricos no cérebro. Em contextos clínicos, EEG refere-se ao registro da atividade elétrica espontânea do cérebro durante um período de tempo, registrado a partir de múltiplos eletrodos colocados sobre o couro cabeludo. Aplicações para diagnóstico, geralmente através da avaliação do conteúdo espectral do EEG, isto é, o tipo de oscilações que podem ser observados no sinal do EEG (Schomer and Silva 2010). Como mostrado na figura 4 e 6 do manuscrito o EEG foi utilizado para avaliar as crises mioclônicas e tônico-clônicas generalizadas, mas foi feito o registro desde o período basal quando o animal era conectado ao aparelho, após a injeção do anticorpo e depois da injeção do PTZ.

Para determinar se o DRRSAb causava algum tipo de alteração por si só, foi avaliado registro no período após a injeção do anticorpo em relação ao seu período

basal, quanto aos ritmos hipocampais de onda Teta e LIA sigla para *large-amplitude irregular activity* ou atividade irregular de grande amplitude. O ritmo teta hipocampal é uma oscilação forte que pode ser observado no hipocampo de algumas espécies de mamíferos, incluindo roedores, coelhos, cães, gatos, morcegos e marsupiais. Em ratos, o ritmo teta é facilmente observado no hipocampo, mas também pode ser detectado de várias outras estruturas corticais e sub-corticais, com frequência de 3-8 Hz, aparece quando o roedor está movimentando-se, como caminhar explorando o ambiente e cheirando, também em períodos do sono. Quando o roedor está comendo, limpando-se ou dormindo, o EEG hipocampo geralmente mostra um padrão não rítmico conhecido como LIA com frequência de 0,5-25 Hz (Buzsaki 2002).

Do mesmo modo que Vorobyov e colaboradores (2011) mostraram que uma única injeção intracerebroventricular do aminoácido excitatório N-metil-D-aspartato aumenta a força relativa delta no EEG do hipocampo de rato, a ativação de Na⁺, K⁺-ATPase em animais não epiléticos pela injeção do DRRSAb aumenta a frequência delta hipocampal quando avaliado o LIA e isso estaria relacionado a um aumento na excitabilidade neuronal, porém sem alteração nas avaliações do ritmo teta (Figura 7 do manuscrito).

Como os animais epiléticos tinham um registro de EEG muito alterado em decorrência das mudanças neuroquímicas e fisiológicas após SE, não foi possível identificar e fazer as avaliações do ritmo teta e LIA nesses animais, isso seria importante, pois já foi demonstrado que a número observado de descargas epiléticas foi reduzida 86-97% do durante teta espontânea e teta induzida por estímulo sensorial (estímulo na cauda) ou química (carbacol), sugerindo que a presença do estado teta independentemente de como ele foi produzido era responsável para a redução da frequência de descarga epilética (Colom, Garcia-Hernandez et al. 2006). Caso o DRRSAb alterasse alguma parâmetro do ritmo teta, responderia o resultado do efeito protetor contra as crises em animais epiléticos.

8. CONCLUSÃO

Considerando os resultados desse trabalho, pode-se concluir que a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase está diminuída em hipocampo de camundongos epiléticos (60 dias pós-*status epilepticus*), que isso pode estar associado a nitração da subunidade α , visto que não alteração na fosforilação no resíduo de Ser943.

Curiosamente, o DRRSAb anticorpo que se liga de forma específica com a subunidade α da Na⁺, K⁺-ATPase e aumenta a sua atividade, foi capaz de diminuir a suscetibilidade às crises mioclônicas induzidas por PTZ em animais epiléticos. Por outro lado, os animais não epiléticos quando tratados com DRRSAb tornaram-se mais suscetíveis as crises induzidas por PTZ.

A análise quantitativa do registro de EEG no hipocampo, revelou que o DRRSAb aumentou a porcentagem de poder total na frequência da banda delta (0-3 Hz), quando analisado o LIA, sem alterar o estado funcional do ritmo teta.

Assim, a ativação Na⁺, K⁺-ATPase, pode tornar-se um alvo farmacológico em potencial na epilepsia do lobo temporal mesial.

9. REFERÊNCIAS

- Andre, V., C. Dube, et al. (2007). "Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model." Epilepsia **48 Suppl 5**: 41-47.
- Aperia, A. (2007). "New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target." J Intern Med **261**(1): 44-52.
- Aperia, A. (2012). "2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺ -adenosine triphosphatase." J Am Soc Nephrol **23**(8): 1283-1290.
- Azarias, G., M. Kruusmagi, et al. (2013). "A specific and essential role for Na,K-ATPase alpha3 in neurons co-expressing alpha1 and alpha3." J Biol Chem **288**(4): 2734-2743.
- Benarroch, E. E. (2011). "Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease." Neurology **76**(3): 287-293.
- Berg, A. T. (2008). "Risk of recurrence after a first unprovoked seizure." Epilepsia **49 Suppl 1**: 13-18.

- Berg, A. T., S. F. Berkovic, et al. (2010). "Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009." Epilepsia **51**(4): 676-685.
- Berg, A. T. and I. E. Scheffer (2011). "New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century." Epilepsia **52**(6): 1058-1062.
- Bialer, M. and H. S. White (2010). "Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs." Nat Rev Drug Discov **9**(1): 68-82.
- Blanco, G. and R. W. Mercer (1998). "Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function." Am J Physiol **275**(5 Pt 2): F633-650.
- Blanco, M. M., J. G. dos Santos, Jr., et al. (2009). "Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylenetetrazole and electroshock models." Epilepsia **50**(4): 824-831.
- Brodie, M. J., A. T. Elder, et al. (2009). "Epilepsy in later life." Lancet Neurol **8**(11): 1019-1030.
- Buzsaki, G. (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." Neuron **33**(3): 325-340.
- Carpio, A. and W. A. Hauser (2009). "Epilepsy in the developing world." Curr Neurol Neurosci Rep **9**(4): 319-326.

- Cavalheiro, E. A. (1995). "The pilocarpine model of epilepsy." Ital J Neurol Sci **16**(1-2): 33-37.
- Chang, B. S. and D. H. Lowenstein (2003). "Epilepsy." N Engl J Med **349**(13): 1257-1266.
- Clapcote, S. J., S. Duffy, et al. (2009). "Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14085-14090.
- Clifford, D. B., J. W. Olney, et al. (1987). "The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures." Neuroscience **23**(3): 953-968.
- Colom, L. V., A. Garcia-Hernandez, et al. (2006). "Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation." J Neurophysiol **95**(6): 3645-3653.
- Covolan, L. and L. E. Mello (2000). "Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus." Epilepsy Res **39**(2): 133-152.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." Clin Chem **52**(4): 601-623.

Devlin, L., M. Odell, et al. (2012). "Epilepsy and driving: current status of research." Epilepsy Res **102**(3): 135-152.

Dichter, M. A. (2007). "Innovative clinical trial designs for future antiepileptic drugs." Epilepsia **48 Suppl 1**: 26-30.

Figuera, M. R., L. F. Royes, et al. (2006). "GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole." Neurobiol Dis **22**(3): 611-623.

Fisher, R. S., C. Acevedo, et al. (2014). "ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy." Epilepsia **55**(4): 475-482.

Fisher, R. S., W. van Emde Boas, et al. (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." Epilepsia **46**(4): 470-472.

Fisone, G., S. X. Cheng, et al. (1994). "Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis." J Biol Chem **269**(12): 9368-9373.

Fujisawa, H., K. Kajikawa, et al. (1965). "Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine." Jpn J Pharmacol **15**(4): 327-334.

- Furian, A. F., M. R. Figuera, et al. (2007). "Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum." Neurochem Int **50**(1): 164-171.
- Grisar, T., D. Guillaume, et al. (1992). "Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review." Epilepsy Res **12**(2): 141-149.
- Habiba, A., G. Blanco, et al. (2000). "Expression, activity and distribution of Na,K-ATPase subunits during in vitro neuronal induction." Brain Res **875**(1-2): 1-13.
- Hauser, W. A., J. F. Annegers, et al. (1996). "Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota." Mayo Clin Proc **71**(6): 576-586.
- Hermann, B., M. Seidenberg, et al. (2008). "The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed?" Lancet Neurol **7**(2): 151-160.
- Hill-Yardin, E. L., A. Argyropoulos, et al. (2015). "Reduced susceptibility to induced seizures in the Neuroligin-3(R451C) mouse model of autism." Neurosci Lett **589**: 57-61.
- Holmstedt, B., S. H. Wassen, et al. (1979). "Jaborandi: an interdisciplinary appraisal." J Ethnopharmacol **1**(1): 3-21.

- Huang, R. Q., C. L. Bell-Horner, et al. (2001). "Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action." J Pharmacol Exp Ther **298**(3): 986-995.
- Illarionava, N. B., H. Brismar, et al. (2014). "Role of Na,K-ATPase alpha1 and alpha2 isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake." PLoS One **9**(6): e98469.
- Jamme, I., E. Petit, et al. (1995). "Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals." Neuroreport **7**(1): 333-337.
- Jorgensen, P. L., K. O. Hakansson, et al. (2003). "Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions." Annu Rev Physiol **65**: 817-849.
- Jurkat-Rott, K., T. Freilinger, et al. (2004). "Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants." Neurology **62**(10): 1857-1861.
- Kaplan, J. H. (2002). "Biochemistry of Na,K-ATPase." Annu Rev Biochem **71**: 511-535.
- Kummer, A., G. C. Nunes, et al. (2005). "[Frequency of epilepsy in psychiatric inpatients]." Rev Bras Psiquiatr **27**(2): 165-166.
- Kupferberg, H. (2001). "Animal models used in the screening of antiepileptic drugs." Epilepsia **42 Suppl 4**: 7-12.

- Kuznetzova, L. V., M. N. Karpova, et al. (2014). "[Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of the brain (pentylentetrazole kindling) and acute seizures reaction of kindled mice C57Bl/6]." Patol Fiziol Eksp Ter(3): 4-8.
- Lee, D. I., M. G. Klein, et al. (2009). "Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase modulates cardiac L-type Ca²⁺ channel function." Mol Pharmacol **75**(4): 774-781.
- Lee, S. K. (2014). "Old versus New: Why Do We Need New Antiepileptic Drugs?" J Epilepsy Res **4**(2): 39-44.
- Lees, G. J., A. Lehmann, et al. (1990). "The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus." Neurosci Lett **120**(2): 159-162.
- Leite, J. P., N. Garcia-Cairasco, et al. (2002). "New insights from the use of pilocarpine and kainate models." Epilepsy Res **50**(1-2): 93-103.
- Li, S. and P. K. Stys (2001). "Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na⁽⁺⁾-dependent transport in spinal cord white matter." Neuroscience **107**(4): 675-683.
- Logvinenko, N. S., I. Dulubova, et al. (1996). "Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase affects its conformational equilibrium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9132-9137.

Loscher, W. (2011). "Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs." Seizure **20**(5): 359-368.

Loscher, W. and C. Brandt (2010). "Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research." Pharmacol Rev **62**(4): 668-700.

Lucchesi, P. A. and K. J. Sweadner (1991). "Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity." J Biol Chem **266**(14): 9327-9331.

Magiorkinis, E., K. Sidiropoulou, et al. (2010). "Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity." Epilepsy Behav **17**(1): 103-108.

Marchetti, R. L. (2004). "[Epilepsy in the shadow of Brazilian psychiatry]." Rev Bras Psiquiatr **26**(1): 67-68.

Marquezan, B. P., V. R. Funck, et al. (2013). "Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na(+),K(+)-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex." Epilepsy Res **105**(3): 396-400.

McDonough, A. A., J. B. Velotta, et al. (2002). "The cardiac sodium pump: structure and function." Basic Res Cardiol **97 Suppl 1**: I19-24.

Ministério da Saúde do Brasil (2005) Portaria 1.161, de Sete de Julho de 2005, disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/GM/GM-1161.htm>.

Moseley, A. E., M. T. Williams, et al. (2007). "Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice." J Neurosci **27**(3): 616-626.

Moshe, S. L., E. Perucca, et al. (2014). "Epilepsy: new advances." Lancet.

Muller, C. J., M. Bankstahl, et al. (2009). "Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage." Eur J Pharmacol **619**(1-3): 15-24.

Neligan, A., W. A. Hauser, et al. (2012). "The epidemiology of the epilepsies." Handb Clin Neurol **107**: 113-133.

Newton, C. R. and H. H. Garcia (2012). "Epilepsy in poor regions of the world." Lancet **380**(9848): 1193-1201.

Nishi, A., G. Fisone, et al. (1999). "Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C." J Neurochem **73**(4): 1492-1501.

- Oliveira, M. S., L. F. Pacheco, et al. (2011). "Epileptiform activity in the limbic system." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 565-593.
- Olney, J. W., T. de Gubareff, et al. (1983). "Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents." Nature **301**(5900): 520-522.
- Perucca, P. and F. G. Gilliam (2012). "Adverse effects of antiepileptic drugs." Lancet Neurol **11**(9): 792-802.
- Poulsen, H., H. Khandelia, et al. (2010). "Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na(+)/K(+)-ATPase." Nature **467**(7311): 99-102.
- Poulsen, H., P. Morth, et al. (2010). "Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase." FEBS Lett **584**(12): 2589-2595.
- Priel, M. R. and E. X. Albuquerque (2002). "Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture." Epilepsia **43 Suppl 5**: 40-46.
- Sander, J. W. (2003). "The epidemiology of epilepsy revisited." Curr Opin Neurol **16**(2): 165-170.
- Saraceno, B. and S. Saxena (2005). "Mental health services in Central and Eastern Europe: current state and continuing concerns." Epidemiol Psichiatr Soc **14**(1): 44-48.

Schomer, D. L. and F. L. Silva (2010). Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields.

Scorza, F. A., R. M. Arida, et al. (2009). "The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?" An Acad Bras Cienc **81**(3): 345-365.

Sharma, A. K., R. Y. Reams, et al. (2007). "Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions." Toxicol Pathol **35**(7): 984-999.

Skou, J. C. and M. Esmann (1992). "The Na,K-ATPase." J Bioenerg Biomembr **24**(3): 249-261.

Smeland, O. B., M. G. Hadera, et al. (2013). "Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice." J Cereb Blood Flow Metab **33**(7): 1090-1097.

Smolders, I., G. M. Khan, et al. (1997). "NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis." Br J Pharmacol **121**(6): 1171-1179.

Stahl, W. L. and W. E. Harris (1986). "Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs." Adv Neurol **44**: 681-693.

Sweadner, K. J. (1989). "Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase." Biochim Biophys Acta **988**(2): 185-220.

- Therien, A. G. and R. Blostein (2000). "Mechanisms of sodium pump regulation." Am J Physiol Cell Physiol **279**(3): C541-566.
- Thurman, D. J., E. Beghi, et al. (2011). "Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy." Epilepsia **52 Suppl 7**: 2-26.
- Turski, L., E. A. Cavalheiro, et al. (1987). "The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents." Pol J Pharmacol Pharm **39**(5): 545-555.
- Turski, L., C. Ikonomidou, et al. (1989). "Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy." Synapse **3**(2): 154-171.
- Turski, W. A., S. J. Czuczwar, et al. (1983). "Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats." Experientia **39**(12): 1408-1411.
- Vorobyov, V., N. Schibaev, et al. (2011). "Cortical and hippocampal EEG effects of neurotransmitter agonists in spontaneously hypertensive vs. kainate-treated rats." Brain Res **1383**: 154-168.
- Wang, J., J. B. Velotta, et al. (2001). "All human Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides." Am J Physiol Cell Physiol **281**(4): C1336-1343.

WHO (2006) World Health Organization Neurological disorders: Public health challenges. Geneva, Switzerland.

Wilden, J. A. and A. A. Cohen-Gadol (2012). "Evaluation of first nonfebrile seizures." Am Fam Physician **86**(4): 334-340.

Xu, K. Y. (2005). "Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase." Biochem Biophys Res Commun **338**(4): 1669-1677.

Xu, K. Y., E. Takimoto, et al. (2006). "Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase induces positive inotropy in intact mouse heart in vivo." Biochem Biophys Res Commun **349**(2): 582-587.

Zheng, J., X. Koh, et al. (2011). "Cardioprotection induced by Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway." Cardiovasc Res **89**(1): 51-59.

Zhang, L. N., Y. J. Sun, et al. (2015). "Glutamate Transporters/Na, K -ATPase Involving in the Neuroprotective Effect as a Potential Regulatory Target of Glutamate Uptake." Mol Neurobiol.