

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

**MONTELUCASTE DIMINUI AS CRISES
CONVULSIVAS EM ANIMAIS ABRASADOS E
POTENCIALIZA O EFEITO ANTICONVULSIVANTE
DO FENOBARBITAL**

TESE DE DOUTORADO

Juliana Fleck

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**MONTELUCASTE DIMINUI AS CRISES CONVULSIVAS EM
ANIMAIS ABRASADOS E POTENCIALIZA O EFEITO
ANTICONVULSIVANTE DO FENOBARBITAL**

Juliana Fleck

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

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).

Fleck, Juliana

Montelucaste diminui as crises convulsivas em animais
abrasados e potencializa o efeito anticonvulsivante do
fenobarbital / Juliana Fleck.-2015.

99 f.; 30cm

Orientador: Carlos Fernando de Mello

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

1. Neuroinflamação 2. Pentilenotetrazol 3. CysLT1 4.
CysLT2 I. Mello, Carlos Fernando de II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Juliana Fleck. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Manoel Ribas, 1429, Santa Maria, RS, 97010-300

Fone (0xx) 55 3220 8727; End. Eletr: jfleck2009@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

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

**MONTELUCASTE DIMINUI AS CRISES CONVULSIVAS EM
ANIMAIS ABRASADOS E POTENCIALIZA O EFEITO
ANTICONVULSIVANTE DO FENOBARBITAL**

elaborada por
Juliana Fleck

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

Comissão Examinadora



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



Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse (Unipampa)



Prof. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal (UFSM)



Prof. Dr. Denis Broock Rosenberg (UFSM)



Prof. Dr. Mauro Alves da Cunha (UFSM)

Santa Maria, 28 de julho de 2015.

Dedico este trabalho ao Jules,
companheiro incondicional na vida,
nos sonhos e no amor.

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Fernando de Mello, pela amizade, seus ensinamentos, paciência e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades. Minha eterna admiração e gratidão.

À minha família, meus pais Arno e Eunice; meus irmãos Eurico e Elisa, meus sobrinhos, especialmente ao João Matteus, meu filho do coração. Agradeço a vocês que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, como ser humano e profissional. Mãe, obrigada por todo o tipo de apoio e incentivo que pude contar.

Ao meu esposo Jules, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias e as renúncias, sempre com amor e compreensão. Obrigada pelo carinho e por sua capacidade de me trazer paz na correria da vida.

Aos professores Ana Flávia, Mauro, Michele e Luiz Fernando pelos ensinamentos, amizade, ajuda e atenção no desenvolver deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Labneuro pelo convívio e pelo apoio em algum momento do meu trabalho: Leonardo, Cristina, Quéli, Leandro, Aline, Alice, Patrícia, Fabiano e Florindo. Às minhas queridas Ana, Josi, Laura e Amanda, pelo auxílio direto na condução dos experimentos. Um agradecimento especial para a minha “ex-eterna aluna” Fe, pela amizade, altruísmo e socorro em todas as horas. Serei eternamente grata. A todos obrigada pela amizade nos momentos de tensão e descontração.

Aos meus colegas do LAC/HUSM, especialmente ao Elehú e à Iara e aos colegas do setor de Imunologia Adriana, Elaine, Lisiane, Miguel, Rosane e Salimara pelo apoio e compreensão nos dias da minha ausência do laboratório.

Aos meus alunos e colegas da Unifra, especialmente à Maria do Carmo, Jane, Silvana, Rosi e Luciane, pelo apoio e pela amizade.

Às amigas e colegas Daniela e Maria do Carmo pelas conversas e conselhos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

À Universidade Federal de Santa Maria pelo incentivo a qualificação.

À CAPES, CNPQ e FAPERGS, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

“Um passo a frente e
você não está mais
no mesmo lugar.”

Chico Science

RESUMO

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

MONTELUCASTE DIMINUI AS CRISES CONVULSIVAS EM ANIMAIS ABRASADOS E POTENCIALIZA O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO FENOBARBITAL

AUTORA: JULIANA FLECK
ORIENTADOR: CARLOS FERNANDO DE MELLO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de julho de 2015.

A epilepsia é uma doença que se manifesta por crises epilépticas recorrentes, não provocadas. Evidências sugerem que a inflamação desempenha um papel na patofisiologia destas crises. Embora os leucotrienos cisteínicos (CysLTs) tenham sido implicados no desenvolvimento de crises convulsivas, nenhum estudo investigou se o bloqueio dos receptores CysLT1 potencializa a ação anticonvulsivante de antiepilépticos clássicos, assim como se a expressão dos receptores de CysLT é alterada por inflamação. Neste estudo mostramos que o agonista inverso de CysLT1, montelukaste, sinergicamente aumenta a ação anticonvulsivante do fenobarbital contra crises convulsivas induzidas em um modelo de injeção aguda de pentilenotetrazol (PTZ). Além disso, é mostrado que o LTD₄ (leucotrieno D₄) previne o efeito do montelukaste. A análise isobolográfica revelou que o valor de DE₅₀ mix, calculado experimentalmente para uma combinação de proporção 1: 1 de montelukaste e fenobarbital foi de $0,06 \pm 0,02$ umol, ao passo que o valor de DE₅₀ add, calculado foi de $0,49 \pm 0,03$ umol. O índice de interação encontrado foi de 0,12, indicando uma interação sinérgica. A associação dos fármacos diminuiu significativamente o DE₅₀ para o efeito anticonvulsivante do fenobarbital de 0,74 para 0,04 umol (na ausência e na presença de montelukaste, respectivamente) e, conseqüentemente, a sedação induzida por fenobarbital em doses equieficazes. Posteriormente foi avaliado se o montelukaste e o fenobarbital diminuem as crises convulsivas em animais previamente abrasados, assim como se o tratamento farmacológico ou o abrasamento alteram a expressão de receptores CysLTs. O montelukaste (10 mg/kg; s.c.) e o fenobarbital (20 mg/kg, s.c.) aumentaram a latência para crises convulsivas generalizadas em camundongos abrasados. O montelukaste aumentou a imunorreatividade do receptor CysLT1 em camundongos não abrasados e que foram desafiados por PTZ que não foram abrasados. Entretanto, o desafio de PTZ diminuiu a imunorreatividade do receptor CysLT2 apenas em camundongos abrasados. Antagonistas do receptor CysLT1 parecem emergir como agentes terapêuticos adjuntos promissores no tratamento de crises refratárias. Não obstante, estudos adicionais são necessários para avaliar as implicações clínicas deste trabalho.

Palavras-chave: Epilepsia. Neuroinflamação. Pentilenotetrazol. CysLT1. CysLT2.

ABSTRACT

PhD Thesis
Pos Graduation Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

MONTELUKAST DECREASES SEIZURES IN KINDLED ANIMALS AND POTENTIATES THE ANTICONVULSANT EFFECT OF PHENOBARBITAL

AUTHOR: JULIANA FLECK
ADVISER: CARLOS FERNANDO DE MELLO
Defense Place and Date: Santa Maria, July 28nd, 2015.

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by recurrent, unprovoked seizures. Evidence suggests that inflammation plays a role in the pathophysiology of seizures. Although cysteinyl leukotrienes (CysLTs) have been implicated in seizures, no study has investigated whether blocking of CysLT₁ receptors potentiates the anticonvulsant action of classic antiepileptic drugs, as well as the expression of CysLT receptors is altered by inflammation. In this study we showed that the inverse agonist of CysLT₁ receptor, montelukast, synergistically increases the anticonvulsant action of phenobarbital against seizures induced in a model of acute injection of pentylentetrazole (PTZ). Furthermore, it is shown that LTD₄ (leukotriene D₄) prevents the effect of montelukast. Isobolographic analysis revealed an ED_{50 mix} value for a fixed-ratio combination (1:1 proportion) of montelukast plus phenobarbital of $0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol}$, whereas the calculated ED_{50 add} value was $0.49 \pm 0.03 \mu\text{mol}$. The interaction index was 0.12, indicating a synergistic interaction. Montelukast significantly decreased the antiseizure DE₅₀ for phenobarbital (0.74 and 0.04 μmol in the absence and presence of montelukast, respectively) and, consequently, phenobarbital-induced sedation at equieffective doses. We also investigated whether the CysLT₁ inverse agonist montelukast and a classical anticonvulsant, phenobarbital, decrease seizures in PTZ-kindled mice and CysLT receptor expression. Montelukast (10 mg/kg, s.c.) and phenobarbital (20 mg/kg, s.c.) increased the latency to generalized seizures in kindled mice. Montelukast increased CysLT₁ immunoreactivity only in non-kindled PTZ-challenged mice. Interestingly, PTZ challenge decreased CysLT₂ immunoreactivity only in kindled mice. CysLT₁ antagonists seem to emerge as promising adjunct therapeutic agents in the treatment of refractory seizures. Notwithstanding, additional studies are necessary to evaluate the clinical implications of this work.

Keywords: Epilepsy. Neuroinflammation. Pentilenotetrazole. CysLT1. CysLT2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cascata da biossíntese cooperativa de leucotrienos entre polimorfonucleares (PMN) e células gliais pela ação da 5-LOX.....	22
Figura 2 – Mecanismo de transdução de sinal e efeitos biológicos após ativação dos receptores para leucotrienos cisteínicos (CysLT) e não cisteínicos (LTB ₄)	24
Figura 3 – Isoblograma de aditividade, sinergismo e antagonismo. A e B são as doses das drogas A e B que produzem igual efeito. Todas as combinações de A e B são representadas pela linha isoblográfica de aditividade. Quando a combinação das doses necessárias para atingir o mesmo efeito é menor, o efeito é supra-aditivo (ponto P) e quando é necessário doses maiores, o efeito é subaditivo (ponto Q)	28
Figura 4 – Receptor GABAA. Sítio de ligação do PTZ e outros ligantes na pós-sinapse.....	30

ARTIGO

Figure 1 – Dose effect curve of phenobarbital (PB) and the combination of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) for the latency to PTZ-induced tonic-clonic seizures in mice	55
Figure 2 – Isobologram showing the calculated additive points for a mixture having 1:1 proportion of doses of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) as their individual potencies at 50% effect level (ED ₅₀) against PTZ-induced tonic-clonic seizure.....	56
Figure 3 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on PTZ-induced seizure.....	57
Figure 4 – Representative EEG electrocorticographic recordings of the right cerebral cortex before and after PTZ injection of animals injected with: (A) vehicle, (B) PB, (C) MTK, (D) PB + MTK or (E) PB + MTK + LTD ₄ ..	58
Figure 5 – Power spectrum analysis of EEG	59
Figure 6 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on spontaneous locomotor activity.....	60

MANUSCRITO

Figure 1 – Time-course for induction of kindling (n=32) after repeated PTZ (35 mg/kg, i.p.) administration	76
Figure 2 – Experimental protocol.....	77
Figure 3 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on PTZ-induced seizures (35 mg/kg, i.p)	78
Figure 4 – Effect of PTZ kindling on CysLT1R (A) CysLT2R (B) immunoreactivity in the cortex.....	79

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 – Determination of ED50 of PB and MTK for latency to PTZ-induced tonic-clonic seizures in mice.....	54
---	----

MANUSCRITO

Table 1 – Effect of montelukast and phenobarbital on seizure frequency induced by PTZ in kindled and non-kindled mice.....	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HpETE	– Ácido 5-hidroperoxi eicosapentanóico
AMPA	– Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AQP4	– Aquaporina 4
AVC	– Acidente vascular cerebral
BHE	– Barreira hematoencefálica
Ca ⁺²	– Cálcio
Cl ⁻	– Cloreto
COX	– Cicloxigenase
CysLT	– Leucotrieno cisteínico
DAG	– Diacilglicerol
DE ₅₀	– Dose efetiva 50
EEG	– Eletroencefalograma
FLAP	– Proteína ativadora da 5-LOX
GABA	– Ácido gama-aminobutírico
GLT-1	– Transportador de glutamato 1
GPCR	– Receptor acoplado a proteína G
GPR17	– Receptor acoplado a proteína G 17
ICV	– Intracerebroventricular
IL	– Interleucina
IP ₃	– 1,4,5 trifosfato de inositol
IP ₃ R	– Receptor de 1,4,5 trifosfato de inositol
K ⁺	– Potássio
Kir4.1	– Canal de potássio de retificação interna
LOX	– Lipoxigenase
LTA ₄	– Leucotrieno A ₄
LTB ₄	– Leucotrieno B ₄
LTC ₄	– Leucotrieno C ₄
LTD ₄	– Leucotrieno D ₄
LTE ₄	– Leucotrieno E ₄
MRP	– Proteínas de resistência a múltiplas drogas
MTK	– Montelukaste

NMDA	– N-metil-D-aspartato
PB	– Fenobarbital
PKC	– Proteína quinase C
PLA ₂	– Fosfolipase A2
PTZ	– Pentilenotetrazol
SNC	– Sistema nervoso central
TCE	– Traumatismo crânio-encefálico
TGFβR2	– Receptor do fator transformador de crescimento beta
TLE	– Epilepsia do lobo temporal
TNF-α	– Fator de necrose tumoral
γ-GT	– γ-glutamil transferase

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	15
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Epilepsia	16
1.2	Convulsão e inflamação	17
1.3	Terapia anticonvulsivante	25
1.4	Estudo da associação de fármacos	27
1.5	Modelo experimental de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ).....	28
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
3.2.1	Objetivos específicos do Artigo.....	33
3.2.2	Objetivos específicos do Manuscrito	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Artigo	34
	MONTELUKAST POTENTIATES THE ANTICONVULSANT EFFECT OF PHENOBARBITAL IN MICE: AN ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS	34
	Abstract	35
	1 Introduction	36
	2 Material and Methods	37
	2.1 <i>Animals</i>	37
	2.2 <i>Reagents</i>	38
	2.3 <i>Surgical procedures</i>	38
	2.4 <i>Determination of ED₅₀ for each drug and combination</i>	39
	2.5 <i>Isobolographic analysis</i>	40
	2.6 <i>Electrocorticographic recording, analysis and seizure evaluation</i>	40
	2.7 <i>Effect of montelukast and phenobarbital on locomotor activity</i>	41
	2.8 <i>Statistical analysis</i>	42
	3 Results	42
	4 Discussion	44
	5 Conclusion	47
	References	47
4.2	Manuscrito.....	61
	MONTELUKAST DECREASES SEIZURES IN PTZ-KINDLED MICE	61
	Abstract	63
	1 Introduction	64
	2 Material and Methods	65
	2.1 <i>Animals</i>	65
	2.2 <i>Reagents</i>	65
	2.3 <i>Kindling induction and seizure observation</i>	66
	2.4 <i>Western blot</i>	67
	2.5 <i>Statistical analysis</i>	67
	3 Results	68
	3.1 <i>Seizure evaluation</i>	68

	3.2 Western blot analysis	68
	4 Discussion	69
	Acknowledgements	72
	References	72
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	85
6.1	Conclusões do Artigo	85
6.2	Conclusões do Manuscrito	85
7	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

APRESENTAÇÃO

O trabalho está organizado da seguinte forma: primeiramente é apresentada a **INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA** e os **OBJETIVOS**. A seguir são apresentados os resultados, na forma de um artigo publicado no periódico *Pharmacological Research* e um manuscrito submetido ao periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e manuscrito. No final deste documento encontram-se os itens **DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** e **PERSPECTIVAS**, no qual há interpretações e comentários gerais sobre o artigo e o manuscrito contidos nesta tese. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** e **PERSPECTIVAS**.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença que se manifesta por crises epiléticas recorrentes, não provocadas, caracterizada por uma predisposição persistente a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (FISHER, 2014). Estima-se que a prevalência mundial da epilepsia seja 1%, sendo que 20 a 30% desses pacientes apresentam epilepsia refratária, ou seja, continuam a ter crises, sem remissão, apesar do tratamento adequado com medicamentos anticonvulsivantes (BANERJEE; FILIPPI; ALLEN HAUSER, 2009; ORGANIZATION, 2015).

A epilepsia afeta indivíduos de todas as idades, raças e gêneros, principalmente a população de baixo nível socioeconômico (BANERJEE; FILIPPI; ALLEN HAUSER, 2009). As altas taxas de epilepsia nos países em desenvolvimento são atribuídas, principalmente, às infecções intracranianas parasitárias, virais ou bacterianas, traumatismo crânioencefálico (TCE) e doenças cerebrovasculares (LI et al., 1985). Por séculos, indivíduos com epilepsia foram afastados da sociedade, sendo proibidos de frequentar locais públicos, casar e ter filhos. O estigma ainda é imposto sobre essas pessoas e prejudica sua vida social, profissional, perspectivas conjugais e autoestima. Como consequência, as pessoas com epilepsia comumente escondem o seu problema e podem deixar de procurar tratamento médico adequado (KALE, 1997; MARCHETTI et al., 2008). Além disso, o risco de suicídio em pessoas com epilepsia é 4 a 10 vezes superior ao da população geral (VERROTTI et al., 2008).

As crises epiléticas têm uma associação histórica com religião e possessão. Os povos antigos acreditavam que os epiléticos eram possuídos por espíritos maus e demônios, crença que explica a etimologia do vocábulo epilepsia, do grego *epilambanein*, que significa atacar, possuir. Apenas no século VI a.C., Hipócrates sugeriu que a epilepsia tinha uma causa orgânica, provavelmente de origem cerebral. Infelizmente, a crença no sobrenatural ou a ligação a uma doença mental e

contagiosa como causa da epilepsia prevaleceu na cultura mundial. Somente com o fim da idade média, a origem da doença foi associada ao cérebro (CARRAZANA et al., 1999; DEVINSKY; LAI, 2008).

As crises epiléticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo (crises focais) ou de área mais extensa, envolvendo os dois hemisférios cerebrais (crises generalizadas). A classificação das crises epiléticas se baseia na sua descrição clínica e nos achados eletroencefalográficos (EEG), resultando em mais de 40 tipos distintos de crises. Esta classificação é definida não só pelo tipo de manifestação, mas também por características clínicas, como padrão de recorrência das crises, causa, idade de início dos eventos epiléticos, presença ou ausência de ocorrência na família, padrões eletroencefalográficos e prognóstico da doença (ENGEL; PEDLEY, 2008).

As crises epiléticas são comuns em doenças neurológicas agudas, como meningoencefalite, trauma cranioencefálico e doenças cerebrovasculares, ou doenças que afetam o metabolismo, como anóxia, estado hipoglicêmico, insuficiência renal e hepática. Essas condições patológicas podem gerar crises epiléticas, contudo não constituem epilepsia (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006; ENGEL; PEDLEY, 2008). As causas da epilepsia são diversas, incluindo mutações genéticas, defeitos em canais iônicos e/ou distúrbios metabólicos, entre outros (CREMER et al., 2009). O processo inflamatório no Sistema Nervoso Central (SNC) também tem sido associado tanto à gênese quanto à perpetuação das crises convulsivas (VEZZANI et al., 2011). Estudos recentes mostram que tanto crises agudas como a epileptogênese podem iniciar com um processo inflamatório (KLEEN; HOLMES, 2008; FABENE; BRAMANTI; CONSTANTIN, 2010; VEZZANI et al., 2011).

1.2 Convulsão e inflamação

A inflamação é uma resposta imunológica que ocorre após o dano celular e tecidual induzido por agentes químicos, físicos ou biológicos. Os principais eventos da reação inflamatória são a migração de leucócitos e o aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, desencadeados pela produção de mediadores

inflamatórios, assim como moléculas anti-inflamatórias (VEZZANI et al., 2011; XANTHOS; SANDKUHLER, 2014). Entretanto, a resposta inflamatória, inicialmente benéfica por promover o reparo tecidual, pode ser prejudicial. A inflamação crônica que dificulta o acesso de substâncias do sangue para o SNC, tais como anticorpos, sistema complemento e fatores de coagulação (XANTHOS; SANDKUHLER, 2014). Além disso, o SNC carece de células dendríticas, de forma que os macrófagos e pericitos vasculares assumem a função de células dendríticas maduras pode causar dano ao tecido, como ocorre em doenças sistêmicas como artrite reumatoide, lúpus e patologias que envolvem o SNC, como esclerose múltipla, acidente vascular encefálico, encefalite e epilepsia (MATYSZAK, 1998; MISRA; TAN; KALITA, 2008).

O SNC possui características peculiares que distinguem a sua resposta imunológica em comparação ao restante do organismo. Considerado imunologicamente privilegiado, o SNC é isolado do resto do organismo e participa muito pouco das respostas imunes. Isso acontece devido à existência de barreiras anatômicas e celulares (NEUMANN, 2000). A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura no SNC (HICKEY; KIMURA, 1988; BALABANOV; BEAUMONT; DORE-DUFFY, 1999). O cérebro também apresenta concentrações elevadas de citocinas imunossupressoras, tais como TGF- β e IL-10 e está repleto de gangliosídeos, que podem ser citotóxicos para os linfócitos T (IRANI; LIN; GRIFFIN, 1996). As citocinas podem diminuir o limiar para a indução da convulsão e/ou prolongar a duração das crises convulsivas (VEZZANI et al., 2011). Além disso, facilitam a morte neuronal, induzem a proliferação celular glial, aumentam a permeabilidade da BHE e inibem a neurogênese (ALLAN; ROTHWELL, 2001). Recentemente, foi descoberta a presença de um sistema linfático funcional no SNC, sugerindo que o dogma do privilégio imunológico do cérebro deve ser revisto. Dessa forma, o mal funcionamento dos vasos linfáticos das meninges também poderia estar relacionado à causa de doenças neurológicas tais como esclerose múltipla e doença de Alzheimer (LOUVEAU et al., 2015).

As células da glia incluem a micróglia e os astrócitos. Essas células fazem parte do sistema imunológico inato no SNC. Os astrócitos são as células mais abundantes do encéfalo e desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC. Estão envolvidos no metabolismo dos neurotransmissores glutamato e GABA; participam na formação da BHE e na defesa imunológica, por meio da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias (VOLTERRA;

MELDOLESI, 2005). Em situações de lesão ou infecção no SNC, a micróglia é ativada e realiza fagocitose. A micróglia compartilha várias outras características dos macrófagos periféricos, como a secreção de IL-1 β e outras citocinas, tais como IL-18, IL-1 α e TNF- α (GUSTIN et al., 2015). As citocinas pró-inflamatórias estimulam a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da micróglia apenas nas áreas do SNC que sofreram alguma lesão. Da mesma forma foi mostrado que o aumento da síntese e liberação de leucotrienos cisteínicos está correlacionado com a reatividade astrocitária (CICCARELLI et al., 2004). Por razões ainda desconhecidas, a proliferação da micróglia ativada e a exacerbação de sua função citotóxica pode comprometer a resolução do processo inflamatório no SNC. Na reatividade astrogliar, a célula tem um ganho funcional anormal e perde a capacidade de suporte do tecido neural. Assim, nestes casos, astrócitos e células da micróglia agem de maneira prejudicial, contribuindo com a liberação sustentada de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, ao invés de reverter o dano neuronal (TOMKINS et al., 2007; VEZZANI; FRIEDMAN, 2011; WALKER; SILLS, 2012). Astrócitos reativos ocorrem tanto em animais modelos experimentais como em pacientes com epilepsia. Nesses casos, os astrócitos também apresentam redução da expressão de transportadores de glutamato e dos canais de potássio (K⁺) retificadores de influxo (canais Kir4.1) (BORDEY; SONTHEIMER, 1998; BEDNER; STEINHAUSER, 2013) responsáveis pela remoção de íons K⁺ que ficam acumulados durante intensa atividade sináptica, gerando crises epiléticas (DEVINSKY et al., 2013; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

O processo inflamatório pode ser tanto causa como consequência da epilepsia (VEZZANI et al., 2011). Estudos relatam a presença de mediadores inflamatórios em tecido cerebral (*post mortem*) de pacientes com epilepsias refratárias, como na epilepsia do lobo temporal (TLE) e na displasia cortical (CHOI et al., 2009; RIAZI; GALIC; PITTMAN, 2010). Além disso, foi mostrado, em modelos experimentais, que a neuroinflamação aumenta a predisposição a crises convulsivas induzidas por ácido caínico e pilocarpina (VEZZANI et al., 2011; VEZZANI; FRIEDMAN, 2011).

Estudos em modelos experimentais têm sugerido que a abertura da BHE tem papel importante na progressão da TLE devido à presença de albumina sérica no parênquima cerebral pós-*status epilepticus*. De fato, uma correlação positiva entre o

grau de abertura da BHE e o número de crises convulsivas foi evidenciada (VAN VLIET et al., 2007; HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012; LENZ et al., 2014).

A adesão de leucócitos ao leito vascular também contribui com a patogênese das crises convulsivas. Os leucotrienos são eicosanóides oriundos da cascata do ácido araquidônico, sendo classificados de acordo com a presença de um resíduo de cisteína em leucotrienos cisteínicos e leucotrienos não-cisteínicos (DENZLINGER, 1996). A principal fonte de ácido araquidônico são os fosfolídeos das membranas celulares, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol encefálico aumenta crises convulsivas após a administração de pilocarpina em ratos (FABENE et al., 2008). Esses dados sugerem uma ligação patogênica entre a interação dos leucócitos com o endotélio, o dano na BHE e a geração de crises convulsivas. Assim, tem sido proposto que as crises estão diretamente associadas com alterações inflamatórias nos vasos sanguíneos do SNC, as quais podem intensificar a adesão de leucócitos circulantes e, conseqüentemente, a permeabilidade vascular (MACNAMARA; WEISS, 2006).

Mediadores inflamatórios, como os leucotrienos, podem desempenhar. O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado que é liberado na célula via hidrólise desses fosfolídeos na posição *sn*-2 do diacilglicerol. Tal liberação é consequência de um aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{+2}), a qual determina a ativação da fosfolipase A_2 citosólica (PLA_{2c}) (BAZAN, 2003). De fato, tem sido mostrado um aumento da atividade da PLA_2 em hipocampo de pacientes com TLE (GATTAZ et al., 2011), assim como em sinaptossoma de cérebro de ratos com crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (YEGIN et al., 2002). Stark e Bazan (2011) mostraram que o acoplamento do receptor glutamatérgico NMDA extrasináptico à PLA_{2c} aumenta a liberação de ácido araquidônico e a expressão da cicloxigenase COX-2, com conseqüente aumento na produção de prostaglandinas (STARK; BAZAN, 2011). A partir da ação da PLA_{2c} , o ácido araquidônico liberado também serve como substrato para a enzima lipoxigenase (LOX) (PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006).

Há cinco lipoxigenases humanas ativas: 5-LOX, 12(S)-LOX, 12(R)-LOX, 15-LOX-1 e 15-LOX-2, classificadas conforme a inserção do oxigênio e, quando necessário, conforme a estereoconfiguração (S ou R). Três isoformas de LOX estão presentes no cérebro: 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX, encontradas em neurônios do córtex, em astrócitos e oligodendrócitos (SMYTH; BURKE; FITZ GERALD, 2006). A

atividade de cada uma destas enzimas resulta na formação de diferentes metabólitos, dependendo do tipo célula e do seu estado de ativação. A 5-LOX migra do citosol para a membrana nuclear (translocação), liga-se à proteína ativadora da 5-LOX (FLAP) e sintetiza o ácido 5-hidroperoxi eicosapentanóico (5-HpETE), dando início, assim, à biossíntese dos leucotrienos a partir da síntese de LTA₄ (Figura 1) (MACNAMARA; WEISS, 2006; PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006). A FLAP é uma proteína transportadora de ácido graxo que entrega o ácido araquidônico à 5-LOX (HORRILLO et al., 2010) e se localiza tanto na membrana interna e externa do envelope nuclear, como na membrana celular (MANDAL et al., 2008). Essa proteína é expressa em neurônios e em várias regiões do cérebro, apresentando uma expressão mais proeminente no hipocampo e no cerebelo (MANEV; UZ; QU, 1998). O LTA₄ pode ser combinado com H₂O, dando origem ao LTB₄ ou conjugado com a glutatona no carbono 6, produzindo LTC₄. Essas reações são catalisadas pela LTA₄ hidrolase e LTC₄ sintase, respectivamente. Os leucotrienos LTB₄ e LTC₄ sofrem extrusão celular via sistemas carreadores localizados na membrana plasmática, os transportadores ABCC1, também conhecidos por “proteína associada a resistência a múltiplas droga 1” (MRP-1). Chegando ao espaço extracelular, o LTC₄ é convertido em LTD₄ pela clivagem do ácido glutâmico pela γ -glutamil transferase (γ -GT), seguida da remoção da glicina por uma dipeptidase, resultando em LTE₄. O LTC₄, o LTD₄ e o LTE₄ são os chamados leucotrienos cisteínicos. O LTC₄ e o LTD₄ que não forem convertidos em LTE₄ são metabolizados e inativados no espaço extracelular, assim como o LTA₄ (DENZLINGER, 1996; CHEBOLU et al., 2010).

Um processo muito importante na produção de leucotrienos é a síntese cooperativa entre as células vizinhas (Figura 1). Uma célula pode doar o ácido araquidônico ou o substrato intermediário LTA₄ para outra célula que, em seguida, dá sequência à síntese. Sendo assim, mesmo que uma célula não possua alguma enzima da via de síntese de leucotrienos, é possível produzi-los. Esta biossíntese é considerada muito importante, porque pode gerar concentrações extremamente elevadas de CysLTs em um determinado local. Desta forma, os leucócitos podem liberar LTA₄ para as células vizinhas, que podem expressar uma das enzimas da cascata de sinalização (por exemplo, LTC₄-sintase), que leva à maior produção de leucotrienos (MACLOUF; MURPHY, 1988; FOLCO; MURPHY, 2006; FARIAS et al., 2007; KIM; JEOUNG; RO, 2010). Farias e colaboradores (2007) também mostraram

que não há uma biossíntese significativa de leucotrienos em cultura primária de neurônios e células gliais de ratos após estímulo com Ca^{+2} . Entretanto, quando LTA_4 exógeno foi adicionado à cultura, neurônios e glia foram capazes de sintetizar LTC_4 . Ao realizar uma cultura combinada de neurônios, células gliais e leucócitos, foi observada uma síntese significativa de LTC_4 e LTD_4 , bem como LTB_4 . Nessas situações, neutrófilos transferem LTA_4 para as células gliais e neurônios, que expressam LTC_4 -sintase e γ -GT e podem dar sequência à síntese de leucotrienos cisteínicos. Desta forma, os neutrófilos que ultrapassassem a BHE poderiam conduzir à síntese imediata de LTB_4 e leucotrienos cisteínicos no encéfalo (FARIAS et al., 2007).

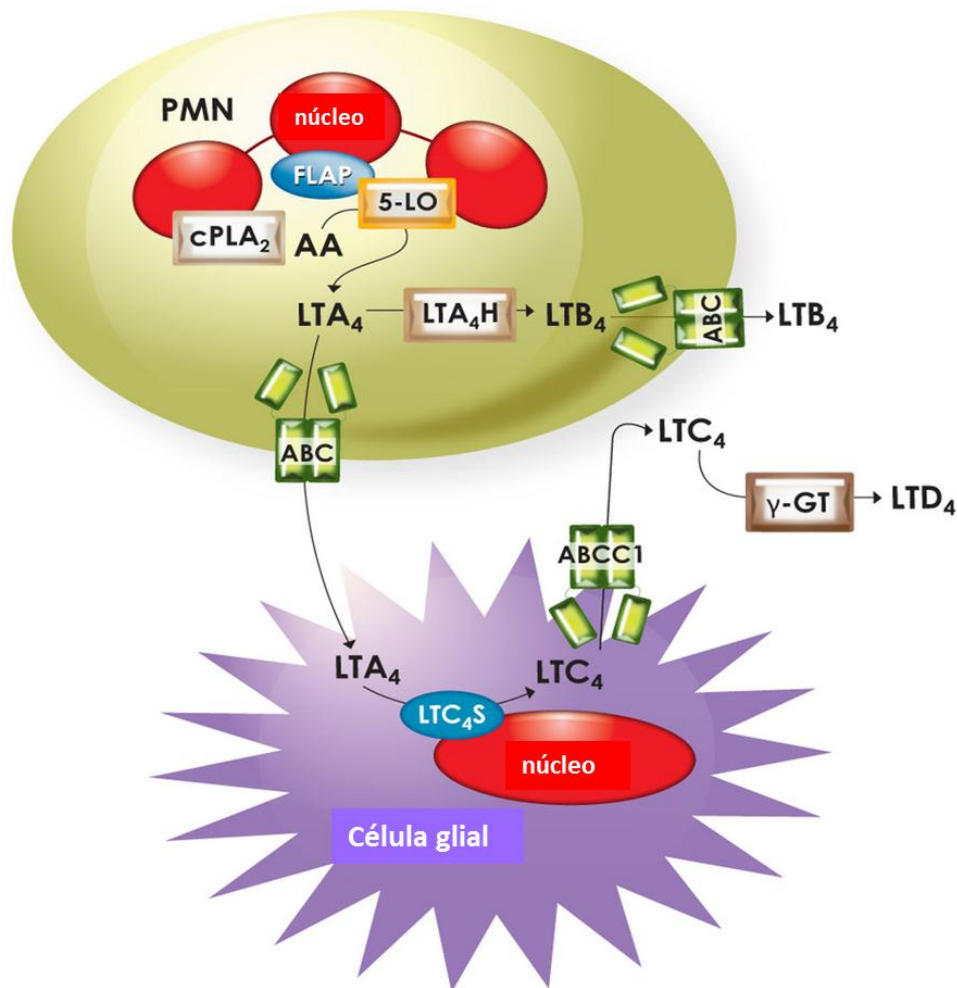


Figura 1 – Cascata da biossíntese cooperativa de leucotrienos entre polimorfonucleares (PMN) e células gliais pela ação da 5-LOX

Fonte: (BROCK, 2010).

Assim como os demais eicosanóides, os leucotrienos exibem diversos efeitos nos sistemas biológicos. Os leucotrienos não-cisteínicos possuem um papel importante no processo inflamatório, em virtude dos seus efeitos quimiotáticos e quimiocinéticos sobre os leucócitos polimorfonucleares. Eles facilitam a adesão dos neutrófilos às células do endotélio vascular e intensificam a migração destes para os tecidos extravasculares. O LTB_4 estimula a quimiotaxia, adesão e agregação de leucócitos polimorfonucleares promovendo a degranulação e a geração de radical superóxido, enquanto que o LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 induz vasodilatação (DENZLINGER, 1996).

Essa capacidade dos leucotrienos cisteínicos de aumentar a permeabilidade vascular é uma das causas do extravasamento da BHE nos processos inflamatórios do SNC (DENZLINGER, 1996; HEDI; NORBERT, 2004). Em traumatismo crânioencefálico, os níveis de LTC_4 e LTD_{a7} aumentam significativamente após 10 minutos e continuam a subir até 1 hora e voltam aos níveis normais em 3 horas após a lesão no tecido cerebral (DHILLON; DOSE; PRASAD, 1996; FARIAS et al., 2009) e no líquido (SCHUHMANN et al., 2003). Além disso, o MK-886, um inibidor da FLAP que previne a síntese de todos os leucotrienos no 1º passo do metabolismo do ácido araquidônico, reduz o volume de lesão no TCE, sugerindo um importante papel dos leucotrienos cisteínicos neste processo (FARIAS et al., 2009).

Até o momento, foram identificados pelo menos quatro tipos de receptores para leucotrienos cisteínicos: GPR17, CysLT(E), CysLT₁ e CysLT₂, sendo os dois últimos considerados de maior importância (SMYTH; BURKE; FITZ GERALD, 2006; BACK et al., 2014). Tanto CysLT₁ quanto CysLT₂ são receptores acoplados à proteína G_q (GPCRs). Ambos receptores apresentam-se distribuídos de forma limitada, sendo CysLT₁ mais abundante no trato respiratório, na musculatura lisa intestinal e nos leucócitos do sangue periférico, enquanto CysLT₂ é expresso principalmente no coração, no baço e na medula suprarrenal (CHEBOLU et al., 2010). Os receptores para leucotrienos cisteínicos também são encontrados no cérebro, principalmente em hipocampo e córtex (SINGH et al., 2010; TANG et al., 2013).

O LTD_4 é o ligante preferencial do receptor CysLT₁, enquanto LTC_4 e LTE_4 possuem afinidades progressivamente mais baixas (CAPRA et al., 2005). A ligação do LTD_4 ativa o receptor, que ativa uma proteína G_q e a fosfolipase C, que produz 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidil inositol

4,5 bisfosfato. O IP_3 , pelo seu caráter hidrofílico, migra para o citosol e se liga a receptores específicos (IP_3R) no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de Ca^{+2} para o citosol. O Ca^{+2} atua como um terceiro mensageiro, desencadeando respostas intracelulares, como excitação nos neurônios e a liberação do ácido araquidônico da membrana celular. O DAG fica associado à membrana plasmática devido à sua estrutura hidrofóbica, onde ativa a proteína quinase dependente de Ca^{+2} (PKC), uma enzima ligada à membrana plasmática que promove a fosforilação de resíduos em diversas proteínas intracelulares (GILMAN, 1987; HAUACHE, 2001; BACK, 2002) (Figura 2).

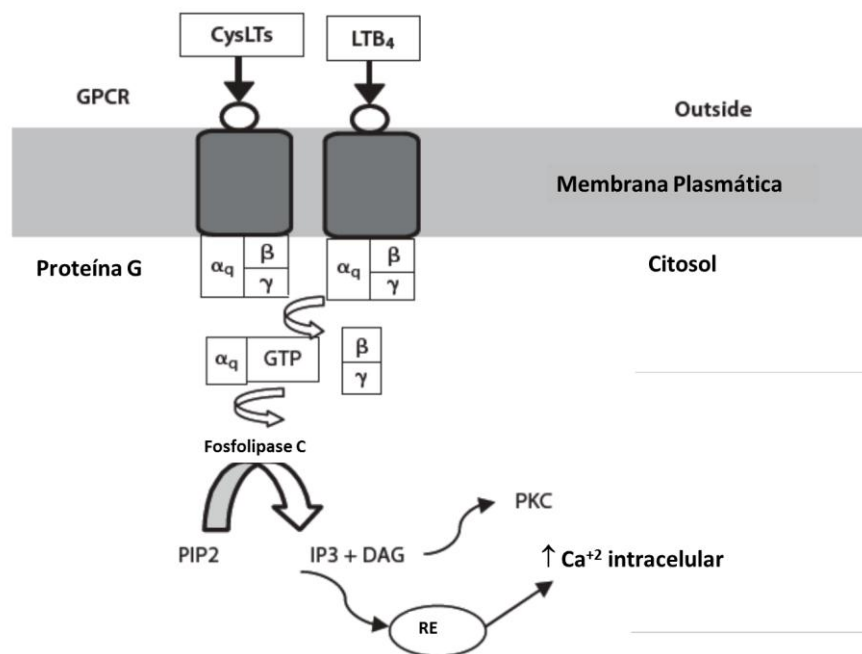


Figura 2 – Mecanismo de transdução de sinal e efeitos biológicos após ativação dos receptores para leucotrienos cisteínicos (CysLT) e não cisteínicos (LTB₄)

Fonte: (adaptado de SYNGH et al., 2010).

No SNC, os inibidores da LOX e antagonistas dos receptores para leucotrienos têm constituído um alvo para o desenho de novos fármacos, tanto para o tratamento de inflamações neurológicas (PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006), como de doenças neurodegenerativas (MANEV, 2000; CHU; PRATICO, 2009). Zhou e colaboradores (2006) mostraram que a isquemia cerebral aumenta a

expressão da 5-LOX em neurônios e astrócitos localizados próximos ao foco isquêmico (ZHOU et al., 2006). Além disso, inibidores seletivos da 5-LOX como zileuton, AA-861 e BW-B70C protegem o cérebro do dano celular decorrente da isquemia cerebral focal (BASKAYA et al., 1996; JATANA et al., 2006; TU et al., 2010). De maneira análoga, e reforçando a ideia do envolvimento dos leucotrienos como mediadores inflamatórios nas crises convulsivas, foi mostrado que a fenidona e seu análogo estrutural BW755C, inibidores das vias COX/LOX, atenuam a neurotoxicidade e as crises convulsivas induzidas por ácido caínico em ratos (KIM et al., 1994; KIM et al., 2000).

Enquanto os leucotrienos facilitam a ruptura da BHE, antagonistas dos receptores CysLT protegem a mesma e diminuem a incidência de encefalite meningocócica (KIM, 2009). A integridade da BHE é de extrema importância não só na prevenção de infecções bacterianas. Sabe-se que uma ruptura da BHE facilita o desenvolvimento de crises convulsivas em virtude de permitir a entrada de substâncias como albumina e K^+ (FRIEDMAN; HEINEMANN, 2012). Fármacos que preservam a integridade da barreira têm potencial de diminuir tais crises convulsivas (FABENE et al., 2008). Foi mostrado recentemente que a injeção intracerebroventricular de montelukaste, um antagonista de receptores CysLT₁, diminui as crises convulsivas induzidas por PTZ e protege a integridade da BHE em camundongos (LENZ et al., 2014). Sendo assim, antagonistas dos receptores CysLT podem ser alvos para o desenvolvimento de fármacos anticonvulsivantes, devido à sua ação anti-inflamatória e protetora BHE.

1.3 Terapia anticonvulsivante

O objetivo do tratamento da epilepsia é controlar as crises e melhorar a qualidade de vida do paciente. A maioria dos fármacos anticonvulsivantes diminui a excitabilidade neuronal. Os principais alvos desses fármacos são os canais de sódio, de K^+ , de Ca^{+2} , receptores GABA_A e receptores NMDA (KLEEN; HOLMES, 2008).

A decisão de iniciar um tratamento anticonvulsivante baseia-se fundamentalmente em três critérios: risco de recorrência de crises, consequências da perpetuação das crises para o paciente, eficácia e efeitos adversos do fármaco

escolhido para o tratamento. Durante muitos anos, o fenobarbital foi o fármaco mais utilizado no controle das crises. Sem dúvida alguma, pela sua eficácia, longa experiência clínica, comodidade de uso e baixo preço, ainda é frequentemente escolhido na terapia da epilepsia (GORZ; SILVADO; BITTENCOURT, 1986; YASIRY; SHORVON, 2012). Além dos aspectos clínicos, o fenobarbital teve um efeito importante sobre a química medicinal da epilepsia, influenciando a descoberta de novos fármacos e auxiliando a desvendar os mecanismos que envolvem esta doença (YASIRY; SHORVON, 2012).

A história dos barbitúricos começou com a síntese do ácido barbitúrico (malonilureia) pelo químico alemão e ganhador do Prêmio Nobel, Adolf von Baeyer, em 1864. Apesar de o ácido barbitúrico não exercer qualquer efeito sobre o SNC, provavelmente porque não é suficientemente lipofílico para penetrar na BHE, formou a base para todos os barbitúricos com atividade central que foram desenvolvidos posteriormente (LOSCHER; ROGAWSKI, 2012).

Em 1911, foi descoberto o fenobarbital, um derivado mais lipofílico do ácido barbitúrico e patenteado como hipnótico. No ano seguinte, o psiquiatra alemão Alfred Hauptmann descobriu a atividade anticonvulsivante do fenobarbital após utilizar como indutor do sono em pacientes com epilepsia. Devido ao grande sucesso clínico dos primeiros barbitúricos, mais de 2500 barbitúricos foram sintetizados nas décadas seguintes, e cerca de 50 são empregados clinicamente (LOPEZ-MUNOZ; UCHA-UDABE; ALAMO, 2005). Apenas alguns barbitúricos mantiveram-se no mercado, e o fenobarbital ainda é amplamente utilizado como fármaco anticonvulsivante e sedativo hipnótico, particularmente nos países em desenvolvimento (KWAN; BRODIE, 2004; BRODIE; KWAN, 2012).

A potencialização da transmissão sináptica GABAérgica é o mecanismo de ação mais aceito para o fenobarbital. O fenobarbital liga-se a um sítio regulatório do receptor GABA_A, prolongando o tempo de abertura dos canais de cloreto (Cl⁻) e causando hiperpolarização da membrana sináptica. Além disso, o bloqueio dos receptores glutamatérgicos AMPA/kainato (NARDOU et al., 2011) e canais de Ca⁺² dependentes de voltagem também podem estar envolvidos no efeito anticonvulsivante do fenobarbital (FFRENCH-MULLEN; BARKER; ROGAWSKI, 1993).

1.4 Estudo da associação de fármacos

Dois ou mais fármacos podem produzir efeitos múltiplos no organismo quando administradas em associação. Esses efeitos podem ser desejáveis ou indesejáveis (efeitos adversos). O principal objetivo da associação de dois fármacos distintos é aumentar a eficácia e, com isso, reduzir as doses e os efeitos colaterais individuais (NIES; SPIELBERG, 1996).

Quando a associação entre os fármacos não modifica o efeito individual para cada uma das drogas, resulta um efeito aditivo. Entretanto, a interação entre fármacos podem resultar em efeitos antagônicos (subaditivos) ou sinérgicos (supra-aditivos). No antagonismo, a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença de outro, muitas vezes pela competição destes pelo mesmo sítio receptor. Já o sinergismo é obtido a partir da associação de dois ou mais fármacos, cuja resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles (NIES; SPIELBERG, 1996; TALLARIDA, 2000).

A análise isobolográfica é utilizada no estudo da associação de dois compostos químicos (medicamentos, herbicidas, inseticidas, etc) em um sistema. Este método é aceito como padrão na detecção de interações farmacológicas, bem como na compreensão do tipo de interação, independente do mecanismo de ação dos fármacos. A partir dos resultados obtidos na curva dose-resposta, é possível determinar a potência da droga através do DE_{50} , ou seja, a dose da droga capaz de fornecer metade do efeito máximo esperado. O isobograma é uma representação gráfica que compara a resposta biológica de uma associação de compostos em doses crescentes quando administrados de forma isolada e combinados entre si (ZHAO; AU; WIENJES, 2010; TALLARIDA, 2012).

Num isobograma, a dose de um fármaco é representada no eixo X e a dose do outro fármaco é representada no eixo Y. Cada ponto marcado no gráfico representa a isobola, que é um par de doses dos dois fármacos que resultam no DE_{50} quando administrados em associação. Esses valores de DE_{50} são teóricos ($DE_{50\text{ add}}$). Se os pontos determinados experimentalmente ($DE_{50\text{ mix}}$) coincidirem com a linha isobolográfica (uma reta traçada entre os DE_{50} de cada fármaco isoladamente), então o efeito dos fármacos em associação será aditivo, não havendo interação. Se os pontos se situarem abaixo da linha isobolográfica, o efeito

será supra-aditivo (sinergismo); se os pontos se encontrarem acima da linha o efeito será subaditivo (antagonismo) (Figura 3) (TALLARIDA, 2000; BOROWICZ et al., 2002; LUSZCZKI et al., 2003).

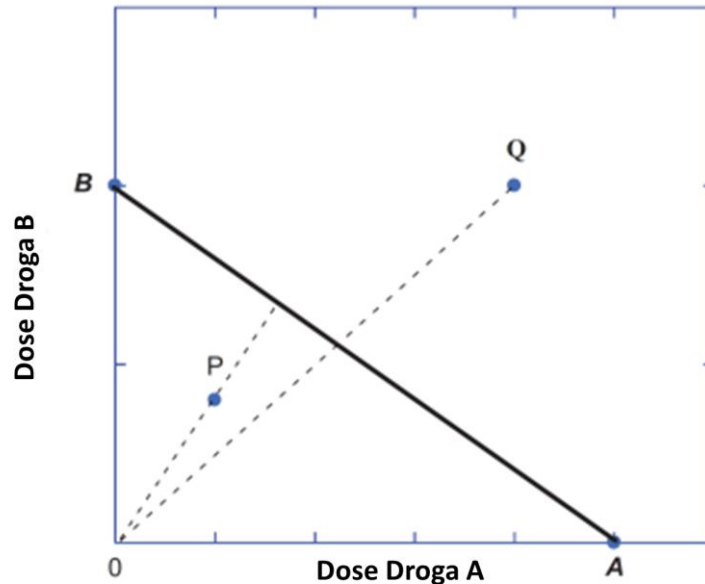


Figura 3 – Isoblograma de aditividade, sinergismo e antagonismo. A e B são as doses das drogas A e B que produzem igual efeito. Todas as combinações de A e B são representadas pela linha isoblográfica de aditividade. Quando a combinação das doses necessárias para atingir o mesmo efeito é menor, o efeito é supra-aditivo (ponto P) e quando é necessário doses maiores, o efeito é subaditivo (ponto Q)

Fonte: (TALLARIDA, 2012).

1.5 Modelo experimental de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ)

Modelos experimentais de epilepsia *in vivo* são amplamente utilizados para investigar os mecanismos da epileptogênese, ou para testar a eficácia de novos compostos antiepiléticos e elucidar os mecanismos de resposta à terapia. Além disso, os modelos animais são essenciais para esclarecer questões que são difíceis de ser respondidas com estudos clínicos, tais como as consequências fisiopatológicas da progressão da doença, os mecanismos celulares de resistência à farmacoterapia e a introdução de novos fármacos. Para obter essas respostas, uma variedade de modelos animais tem sido desenvolvida. Entre eles, modelos genéticos

(como o desenvolvimento de animais nocaute), modelos elétricos (como o abrasamento) e diversos modelos farmacológicos, como aqueles que usam ácido caínico, pilocarpina, penicilina, 4-aminopiridina, toxina colérica, bicuculina, picrotoxina, PTZ, etc. (LOSCHER, 2002; CREMER et al., 2009).

A maioria dos fármacos antiepiléticos possui uma janela terapêutica estreita. Dessa forma, o controle das crises em pacientes com epilepsia refratária é muitas vezes dificultado pela indução de efeitos adversos (MELDRUM, 2002). Isso enfatiza a importância de avaliar tanto a eficácia anticonvulsivante como os efeitos adversos durante a avaliação pré-clínica de novos candidatos a drogas anticonvulsivantes. Vários modelos animais de crises agudas e epilepsia crônica são utilizados para avaliar a potência e eficácia de potenciais fármacos antiepiléticos assim como a dose tóxica (DT_{50}) e a dose anticonvulsivante eficaz (DE_{50}) (LOSCHER; SCHMIDT, 1994; KLITGAARD; MATAGNE; LAMBERTY, 2002).

Considerado de alto valor preditivo de eficácia na clínica, o modelo de crises convulsivas induzidas pelo PTZ é utilizado tanto para o desenvolvimento de novos agentes anticonvulsivantes como para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas crises. O PTZ também é utilizado como modelo de ansiedade. Atualmente, não é mais utilizado na terapia clínica, exceto em raros casos de intoxicações com barbitúricos (JUNG; LAL; GATCH, 2002). O PTZ é um antagonista competitivo do receptor $GABA_A$, provavelmente por uma interação alostérica no canal de Cl^- ativado por GABA (Figura 4). Assim, o PTZ reduz os efeitos inibitórios do GABA endógeno, o que leva o sistema nervoso a um estado de hiperexcitabilidade (HUANG et al., 2002). Em doses elevadas (acima de 80 mg/kg), o PTZ induz crises convulsivas generalizadas tônico-clônicas em segundos. Anticonvulsivantes não GABAérgicos como fenitoína, carbamazepina e etossuximida não são plenamente eficazes contra as crises induzidas por PTZ (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006; CREMER et al., 2009).

As principais vantagens do uso do PTZ são a degeneração neuronal mínima e o curto período de latência para a primeira convulsão tônico-clônica generalizada, ao contrário de modelos de convulsão como ácido caínico e pilocarpina (ENGEL; PEDLEY, 2008; CREMER et al., 2009). Os dois modelos utilizados neste trabalho são a administração aguda de PTZ em uma dose convulsivante (modelo agudo) e a administração crônica de PTZ em doses subconvulsivantes (modelo de abrasamento). A administração de uma dose submáxima aguda de PTZ causa

alterações eletrográficas semelhantes àsquelas observadas nas crises de ausência e mioclônicas em humanos (LOSCHER; SCHMIDT, 1988; FISHER, 1989). Já o modelo de abrasamento é um processo pelo qual a administração repetida de doses baixas do agente convulsivante sensibiliza o sistema nervoso para o desenvolvimento de crises epiléticas, sendo um modelo animal de epileptogênese (KUPFERBERG, 2001).

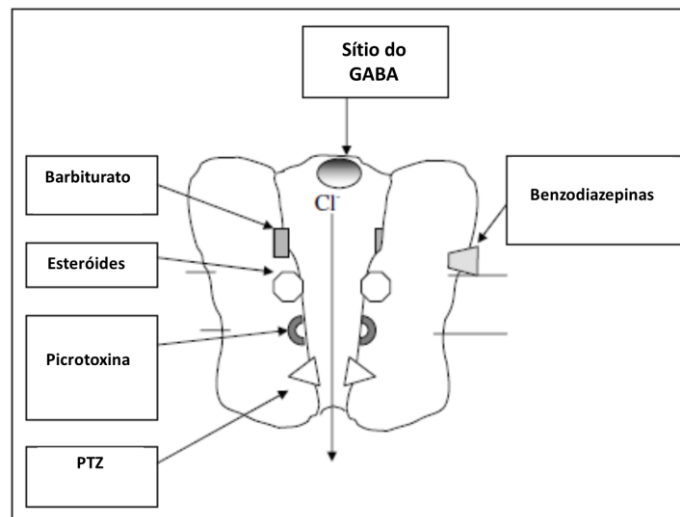


Figura 4 – Receptor GABA_A. Sítio de ligação do PTZ e outros ligantes na pós-sinapse

Fonte: (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006).

Durante as crises tônico-clônicas agudas ou por abrasamento induzidas pelo PTZ em camundongos, ocorrem alterações tempo-dependentes na expressão de alguns receptores. O tratamento crônico com PTZ induz uma diminuição na densidade de receptores para cainato e nos sítios de ligação dos receptores de adenosina do tipo A₁ e aumento nos sítios de ligação dos receptores NMDA e benzodiazepínicos (CREMER et al., 2009). O córtex e o hipocampo são as áreas cerebrais mais afetadas pelo fenômeno de abrasamento. O abrasamento induzido pelo PTZ também aumenta a atividade das enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase nestas estruturas cerebrais, enquanto que a atividade da creatina quinase é diminuída no córtex e cerebelo. Entretanto, as crises agudas de mesma intensidade induzidas pelo PTZ não causam estas alterações metabólicas, o que significa que estes efeitos estão relacionados ao

fenômeno de abrasamento e não às crises convulsivas (ERAKOVIC et al., 2001). Contudo, não se sabe, se o abrasamento pode alterar a expressão dos receptores CysLT nas estruturas cerebrais.

2 JUSTIFICATIVA

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns, afetando mundialmente aproximadamente 50 milhões de pessoas. Um terço dos indivíduos epiléticos é refratário ao tratamento com os anticonvulsivantes atuais, apesar da ampla variedade de drogas antiepilépticas disponíveis (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006; PERUCCA; FRENCH; BIALER, 2007; CREMER et al., 2009).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na indução e manutenção das crises convulsivas é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da epilepsia (PERUCCA; FRENCH; BIALER, 2007). Um dos mais tradicionais fármacos usados na clínica para o tratamento da epilepsia é o fenobarbital. Este foi o primeiro anticonvulsivante a ser utilizado na clínica e ainda é considerado um dos mais clássicos tratamentos, principalmente nos países em desenvolvimento (BRODIE; KWAN, 2012).

Com foco no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na epilepsia, diversas pesquisas têm sucesso, não só com agentes antimicrobianos e anticonvulsivantes, mas também com fármacos anti-inflamatórios (SINGH; PRABHAKAR, 2008). Dentre os mediadores inflamatórios, os leucotrienos desempenham papel importante mostrando evidências de que o processo inflamatório cerebral pode facilitar as crises convulsivas (OLIVEIRA et al., 2008; MAROSO et al., 2010; VEZZANI et al., 2011). Alguns estudos têm mostrado que infecções cerebrais, como encefalites e meningites bacterianas, podem provocar crises convulsivas as quais podem ser tratadas com a indução, manutenção e resolução de processos de inflamação. Essa capacidade dos leucotrienos cisteínicos de aumentar a permeabilidade vascular é uma das causas do extravasamento de substâncias através da BHE nos processos inflamatórios (DENZLINGER, 1996; HEDI; NORBERT, 2004). Neste contexto, torna-se importante verificar se um antagonista dos receptores para leucotrienos (Cys-LT₁), o montelucaste, potencializa a ação anticonvulsivante do fenobarbital sobre as crises convulsivas induzidas por PTZ.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do montelucaste, um agonista inverso dos receptores CysLT₁, sobre as crises convulsivas induzidas por PTZ em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivos específicos do Artigo

- Verificar se o montelucaste potencializa o efeito anticonvulsivante do fenobarbital nas crises convulsivas induzidas pelo PTZ;
- Determinar o tipo de interação entre o montelucaste e o fenobarbital nas crises convulsivas induzidas pelo PTZ;
- Avaliar a participação de receptores CysLT₁ na potencialização do efeito anticonvulsivante do fenobarbital pelo montelucaste.

3.2.2 Objetivos específicos do Manuscrito

- Verificar se o montelucaste altera as crises convulsivas induzidas por PTZ em camundongos que foram submetidos a abrasamento;
- Verificar se o fenobarbital altera as crises convulsivas induzidas por PTZ em camundongos que foram submetidos a abrasamento;
- Verificar se o abrasamento (salina ou PTZ), o tratamento farmacológico (salina, montelucaste ou fenobarbital) e o desafio (salina ou PTZ) alteram a imunorreatividade do receptor CysLT₁ e do receptor CysLT₂ em córtex de camundongos.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo

MONTELUKAST POTENTIATES THE ANTICONVULSANT EFFECT OF PHENOBARBITAL IN MICE: AN ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS

Juliana Fleck, Joseane Righes Marafiga, Ana Cláudia Jesse, Leandro Rodrigo
Ribeiro, Leonardo Magno Rambo, Carlos Fernando Mello,

Artigo publicado no periódico
Pharmacological Research, n. 94, p. 34-41, 2015

Montelukast Potentiates the Anticonvulsant Effect of Phenobarbital in Mice: An Isobolographic Analysis

Juliana Fleck^{1,2,3}, Joseane Righes Marafiga¹, Ana Cláudia Jesse¹, Leandro Rodrigo Ribeiro¹, Leonardo Magno Rambo¹ and Carlos Fernando Mello^{1,*}

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

²University Hospital of Santa Maria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Pharmacy Department, Center of Health Sciences, Franciscan University Center, RS, Brasil

*Corresponding author. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima,1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil

Tel: +55 55 3220 9378; fax: + 55 55 3220 8241

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

Abstract

Although leukotrienes have been implicated in seizures, no study has systematically investigated whether the blockade of CysLT₁ receptors synergistically increases the anticonvulsant action of classic antiepileptics. In this study, behavioral and electroencephalographic methods, as well as isobolographic analysis, are used to show that the CysLT₁ inverse agonist montelukast synergistically increases the anticonvulsant action of phenobarbital against pentylenetetrazole-induced seizures. Moreover, it is shown that LTD₄ reverses the effect of montelukast. The experimentally derived ED_{50mix} value for a fixed-ratio combination (1:1 proportion) of

montelukast plus phenobarbital was $0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol}$, whereas the additively calculated $\text{ED}_{50 \text{ add}}$ value was $0.49 \pm 0.03 \mu\text{mol}$. The calculated interaction index was 0.12, indicating a synergistic interaction. The association of montelukast significantly decreased the antiseizure ED_{50} for phenobarbital (0.74 and 0.04 μmol in the absence and presence of montelukast, respectively) and, consequently, phenobarbital-induced sedation at equieffective doses. The demonstration of a strong synergism between montelukast and phenobarbital is particularly relevant because both drugs are already used in the clinics, foreseeing an immediate translational application for epileptic patients who have drug-resistant seizures.

1-Key words: montelukast, phenobarbital, seizure, isobolographic analysis.

Chemical compounds studied in this article

Pentylentetrazole (PubChem CID: 5917); Montelukast (PubChem CID: 5281040); Phenobarbital (PubChem CID: 23674889); Sodium chloride (PubChem CID: 5234); Leukotriene D₄ (PubChem CID: 6435286); Dimethyl sulfoxide (PubChem CID: 679); Propylene glycol (PubChem CID: 1030).

1 Introduction

Accumulating evidence suggests a role for inflammatory mediators in seizures, from early pathogen- and damage-associated molecular pattern recognition to late arachidonic acid derivatives production and signaling [1-9]. While there are several studies suggesting a role for COX-derived arachidonic acid metabolites in seizures, only a few have investigated a role for lipoxygenase (LOX)-derived arachidonic acid metabolites. Leukotrienes levels increase in the brain during kainate-induced seizures. Moreover, phenidone and BW755C, dual inhibitors of LOX/COX pathways, decrease kainic acid-induced seizures, suggesting the involvement of leukotrienes in this effect [10, 11]. In line with this view, Rehni and Singh (2011) have shown that montelukast, a CysLT₁ receptor inverse agonist [12]

and 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, regarded as a LTD₄ synthetic pathway inhibitor, dose-dependently suppress the development of kindled seizures, as well as pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures [13]. Similarly, Liu and colleagues (2014) have shown that zileuton, a 5-LOX inhibitor, decreases spike-wave discharges in pilocarpine epileptic rats [14]. Interestingly, it has been recently shown that while LTD₄ facilitates and montelukast, pranlukast (a CysLT₁ antagonist) and Bay-u9773 (a dual CysLT₁/CysLT₂ antagonist) decrease PTZ-induced seizures and BBB permeability disruption [15]. Notwithstanding, low doses of LTD₄ (0.2 and 2 pmol, i.c.v.) prevent the anticonvulsant, but not the protective effect of MTK on BBB. The dissociation of these effects suggests that BBB maintenance does not determine the anticonvulsant effect of montelukast [15], and that an alternative mechanism to decrease excitability shall exist. In fact, it has been long known that LTD₄ increases the firing rate of Purkinje cells *in vivo* [16], suggesting an excitatory role for this lipid mediator.

Since none of the classic anticonvulsants used in the clinics has the CysLT₁ receptor as a target, we hypothesized that the combination of a CysLT₁ receptor inverse agonist with a classic anticonvulsant could be advantageous. Therefore, we tested whether the association of montelukast with a classic anticonvulsant, phenobarbital, would result in a synergistic anticonvulsant effect. This is particularly relevant because both drugs are safely used in the clinics, and the demonstration of an increased anticonvulsant efficacy could have an immediate translational application for the approximately one third of the epileptic patients who are considered to have drug-resistant seizures [17, 18]. Therefore, in the current investigation we determined, by isobolographic analysis [19], whether the combination of montelukast and phenobarbital results in sub-additive, additive or supra-additive anticonvulsant effects.

2 Material and Methods

2.1 Animals

Adult female Swiss mice (25 ± 3 g), housed ten to a cage (35 cm L x 52 cm W x 17 cm H) were used. All animals were kept in colony cages under controlled light and environment (12:12-h light/dark cycle, 24 ± 1°C, 55% relative humidity) with free

access to food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water. Animals were obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria habituated to laboratory conditions 48 h before each experiment. Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle, from 9:00 to 17:00 h in accordance with the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), with the approval of Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria (authorization number: 084/2013). All protocols were designed aiming to reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering. One hundred and nine animals were used in the experiments designed to determine synergism. Twenty nine animals were used in the experiments designed to determine the effects of montelukast and phenobarbital on electrocorticographic recorded seizures, leukotriene reversal of montelukast effects and locomotor activity.

2.2 Reagents

PTZ was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), LTD₄ and montelukast were from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and phenobarbital was from Cristália Pharmaceutical Co (São Paulo, Brazil). PTZ was dissolved in sterile 0.9% NaCl. Phenobarbital and montelukast were dissolved in 0.5% dimethyl sulfoxide and sterile apyrogenic saline containing 10% propylene glycol. Fresh drug solutions were prepared on each day of experimentation.

2.3 Surgical procedures

All animals were anesthetized with ketamine/xylazine intraperitoneally (100/10 mg/kg, i.p.), and had a 27-gauge guide cannula implanted 1 mm above the right lateral ventricle, under stereotaxic guidance for intracerebroventricular (i.c.v.) injection. The following stereotaxic coordinates relative to bregma were used: AP 0 mm, ML 0.9 mm, V 1.6 mm from the dura [20]. The cannula was fixed to the skull with dental acrylic cement.

For EEG recording, two screw electrodes were implanted over the frontoparietal cortices (bilaterally) keeping intact both the dura and cortex surface (coordinates in mm: AP -4.5 and L 2.5). An additional stainless steel screw electrode was driven into the skull positioned over the nasal sinus, and served as a reference

electrode. The electrodes were connected to a multipin socket and were fixed to the skull with dental acrylic cement. After surgery, all mice were injected subcutaneously with buprenorphine hydrochloride (0.01 mg/kg, s.c.) for amelioration of pain and chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) to prevent infection. The experiments were performed 7 days after surgery.

2.4 Determination of ED₅₀ for each drug and combination

The criterion of anticonvulsant efficacy was the latency to tonic-clonic seizures, that was transformed to percentage of maximal effect against PTZ-induced tonic-clonic generalized seizures [%ME=measured latency (in seconds)/1200*100]. The ED₅₀ for the anticonvulsant effect of phenobarbital and montelukast, alone, was calculated based on dose-effect curves. Phenobarbital was administered alone at adjusted doses of 0.09, 0.18, 0.3, 0.5, 0.9, 1.4, 2.7 and 4.5 µmol/25 g (µmol/animal, i.p.), whereas montelukast was administered at the doses of 0.02, 0.05, 0.07, 0.1, 0.17 and 0.3 µmol/animal (i.c.v.). The percentage of maximal effect was plotted against the logarithm of drug doses and the curves were fitted using linear regression analysis. The ED₅₀ was calculated from respective linear equations according to Tallarida (2000) [19]. The estimated ED₅₀ for each drug was the basis for the fixed ratio combination of phenobarbital and montelukast used to determine synergism.

Mean additive doses of the mixture of phenobarbital and montelukast that should theoretically afford a 50% protection against PTZ-induced seizures (ED_{50 add}) were calculated from general equations of additivity, as follows: $a/A + b/B = 1$; where “a” and “b” are doses of phenobarbital and montelukast that were co-administered and “A” and “B”, the ED₅₀ of drugs administered alone. The anticonvulsant activity of the mixture of phenobarbital with montelukast at the fixed-ratio of 1:1 was evaluated and expressed as ED_{50 mix}, that is the calculated dose of the mixture of both drugs that afford a 50% protection against PTZ-induced seizures. The doses of phenobarbital and montelukast in the mixture were determined by multiplying the ED₅₀ for each drug by the respective proportions of drugs in the mixture. For instance, the two-drug mixture for the combination of 1:1 consisted of phenobarbital (0.5 x 0.74 µmol = 0.37 µmol) plus montelukast (0.5 x 0.25 µmol = 0.125 µmol). Drugs were combined in equi-effective doses, as follows: 0.02 + 0.008; 0.05 + 0.016; 0.09 + 0.031; 0.185 + 0.063; 0.37 + 0.125 and 0.74 + 0.25 µmol for phenobarbital and montelukast, respectively.

2.5 Isobolographic analysis

The isobolographic analysis is experimental method in pharmacological determination of drug interactions that is currently accepted as the standard method for detecting drug interactions and provides the understanding the real nature of these interactions, regardless of their mechanism of action or the nature of relations [24].

Isobolographic analysis of interactions between phenobarbital and montelukast was performed according to Tallarida (2000). This analysis is based on a comparison of equieffective drug doses, determining pharmacological interactions. ED_{50} values are placed on the isobologram, which consists of the additive line that intercepts each EC_{50} on the X- and Y-axes. This line of additivity has cartesian coordinates that represent all possible combinations of drugs in equieffective doses and represents the theoretical isobole for an additive effect. When the experimentally determined ED_{50} of 1:1 combinations are placed on this line, the two-drug mixture exerts purely additive interaction; if ED_{50} is placed significantly below this line, the two drugs act synergistically (supra-additive) and if ED_{50} is plotted above the additive isobole, it is an antagonism (sub-additive) interaction. From these values, the theoretical additive ED_{50} ($ED_{50\text{add}}$) was calculated and determined whether it differed from the experimentally determined ED_{50} ($ED_{50\text{mix}}$) of co-administered drugs [19].

2.6 Electrographic recording, analysis and seizure evaluation

Since seizures may occur in the absence of evident behavioral manifestations, the experimentally determined ED_{50} was chosen for a subsequent EEG analysis of the effect of montelukast, phenobarbital and phenobarbital + montelukast or respective vehicle on PTZ-induced seizures. We also determined whether LTD_4 reversed the anticonvulsant effect of the combination of montelukast and phenobarbital. Montelukast (0.25 μmol , i.c.v.), phenobarbital (0.74 μmol , p.o.) or the combination of montelukast (0.02 μmol , i.c.v.) and phenobarbital (0.04 μmol , p.o.) were injected 30 min before PTZ (60 mg/kg, i.p.) and LTD_4 (2, 20 or 200 pmol, i.c.v.) or vehicle were injected 15 min before PTZ. The animals were allowed to habituate to a glass cage (30 cm L \times 20 cm W \times 20 cm H) for at least 30 min before the electroencephalographic (EEG) recording. The mice were then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage. Routinely, a 10 min baseline recording

was obtained to establish an adequate control period and animals were injected with testing drugs according to each specific experimental protocol. The EEG was recorded using a digital electroencephalographer (PowerLab, AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia). EEG signals were preamplified (100 x) by a head mounted amplification system (Pinnacle Technology Inc., Lawrence, KS, USA), filtered (0.1-70.0 Hz, bandpass; 60 Hz Notch), digitalized (sampling rate 1000 Hz) and stored in a PC for off-line analysis.

Post-PTZ EEG recordings were analyzed for the appearance of epileptiform discharges, defined as a high-amplitude (twice the baseline) rhythmic discharge containing a burst of slow waves, spike wave and/or polyspike-wave components and lasting < 5 s [21]. The fold-increase of ictal electroencephalographic recordings amplitude relative to mean baseline, and number of epileptiform discharges after PTZ administration were compared among groups. The behavior of each animal was recorded during the whole EEG acquisition period with a digital camera, and videotapes were used to identify nonconvulsive seizures and possible artifacts.

Digitalized data from basal, montelukast and phenobarbital administration or its combination were visually selected according to the videotaped animal behavior. Episodes in which the animals presented similar behavior (i.e. wakefulness) from basal and after treatment periods were identified in EEG recording and divided in 15s segments and a 4s epoch from each segment (without artifacts) was used to carry out the power analysis by the conversion into frequency domain by fast Fourier transformation (FFT) method. The resultant power values displayed for each frequency were grouped into 5 bands represented by delta (0.1–4 Hz), theta (4–8 Hz), alpha (8–12 Hz), beta (12–30 Hz) and gamma (30-80 Hz). For power analysis of decomposed waves, the power sum from all frequencies (0.1-80 Hz) was considered as 100%. We used the same 4s epoch to analyze the 90% Spectral Edge Frequency (SEF90) and the Total Power (from 0.1 to 80 Hz, expressed in absolute values).

2.7 Effect of montelukast and phenobarbital on locomotor activity

Phenobarbital is a widely-prescribed antiepileptic drug (AED) for the treatment of partial and generalized seizures. However, drowsiness, sedation and hypnosis are known side effects associated with its use [22]. Therefore, we investigated whether the effective anticonvulsant combination of montelukast and phenobarbital decreased locomotor behavior, when compared with the equieffective doses of phenobarbital

and montelukast, given alone. Mice were treated with the vehicle and the equieffective doses relative determined EC_{50} : montelukast (0.25 μmol , i.c.v.), phenobarbital (0.74 μmol , p.o.) or the combination of montelukast (0.02 μmol , i.c.v.) and phenobarbital (0.04 μmol , p.o.), placed in a glass cage that had its floor divided into four areas (quadrants), and had their behavior recorded by a videocamera for 30 min. The videotapes were used to determine the number of quadrants crossed (number of crossings) in the apparatus for 10 min, 20 min after drug injections. A single observer, unaware of the previous pharmacological treatment, observed and rated all animals in this study.

2.8 Statistical analysis

Statistical comparison of experimental $ED_{50\text{mix}}$ with $ED_{50\text{add}}$ was carried out by Student's T-test, with transformation of 95% confidence limits calculated with ED_{50} values into S.E.M. If the $ED_{50\text{mix}} = ED_{50\text{add}}$ (points on the isobole of additivity), the interaction is considered additive; $ED_{50\text{mix}} < ED_{50\text{add}}$ (points below the isobole of additivity), the interaction is synergistic and $ED_{50\text{mix}} > ED_{50\text{add}}$ (points above the isobole of additivity), an antagonistic combination is assumed [19].

Amplitude fold-increase and number of epileptiform discharges data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. These data are presented as mean and S.E.M. Number of crossings was analyzed by Kruskal-Wallis followed with Dunn's multiple comparison test and is expressed as median \pm interquartile range because these variables did not meet ANOVA assumptions (normal distribution and homoscedasticity). A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

All statistical tests and graphically illustrations were performed using Graphpad Prism 6.0 and Microsoft Excel for Windows

3 Results

Figure 1 shows that the association of montelukast and phenobarbital (in a 1:1 proportion) resulted in a potentiation of the anticonvulsant effect of phenobarbital because montelukast caused a left shift of the dose-effect curve. Dose-effect curves

for phenobarbital, montelukast and montelukast + phenobarbital were used to determine ED₅₀ values, which were used in the subsequent isobolographic analysis.

Isobolographic analysis of the combination of phenobarbital with montelukast at the fixed-ratio of 1:1 resulted in a supra-additive (synergistic) effect of these compounds on PTZ-induced tonic-clonic seizures in mice (Figure 2). Results are presented as 50% effective doses (ED₅₀ values in $\mu\text{mol} \pm \text{S.E.M.}$) for two-drug mixtures, determined either experimentally (ED_{50mix}) or theoretically calculated (ED_{50add}) from the equations of additivity [19, 23]. The experimentally derived ED_{50mix} value for this fixed-ratio combination was $0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol}$, whereas the additively calculated ED_{50add} value was $0.49 \pm 0.03 \mu\text{mol}$ (Table 1). The calculation of the interaction index ($\alpha = \text{ED}_{50\text{mix}}/\text{ED}_{50\text{add}}$) in the presence of montelukast resulted in a value of 0.12, indicating a synergistic interaction [24, 25]. The montelukast plus phenobarbital combination, at the dose corresponding to the ED_{50 add}, increased the latency to tonic-clonic PTZ-induced seizures (see Figure 1 and videos on supplementary material).

We confirmed the behaviorally assessed potentiation of anticonvulsant effect of phenobarbital by montelukast by EEG analysis. Figure 3A shows the quantitative analysis of ictal EEG trace amplitude along time in each hemisphere after PTZ injection. Animals were treated with the doses of the estimated ED₅₀ of phenobarbital ($0.74 \mu\text{mol}$, p.o.), montelukast ($0.25 \mu\text{mol}$, i.c.v.), combination of phenobarbital ($0.04 \mu\text{mol}$, p.o.) + montelukast ($0.02 \mu\text{mol}$, i.c.v.). Statistical analysis (ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) revealed that phenobarbital, montelukast and phenobarbital + montelukast decreased the fold-increase of amplitude of ictal EEG traces [$F(6,22)=9.911$; $p<0.001$; Fig. 3A] and the number of epileptiform discharges induced by PTZ administration in a 20 min observation compared with control group [$F(6,22)= 3.62$; $p<0.05$; Fig. 3B]. The anticonvulsant effect was more pronounced in the group treated with the combination phenobarbital + montelukast. There was no significant difference between hemispheres (data not shown).

If the anticonvulsant action of montelukast, a CysLT₁ receptor inverse agonist, were due to an interaction with CysLT₁ receptor, the administration of the respective CysLT receptor agonist LTD₄ should reverse the effect of montelukast. As expected, the administration of LTD₄, at the dose of 200 pmol, completely reversed the synergistic effect of montelukast. Statistical analysis (ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) revealed that LTD₄ dose-dependently (200

pmol, i.c.v.) antagonized the effect of the combination of montelukast and phenobarbital on both ictal amplitude increase [$F(6,22)=9.911$, $p<0.001$; Fig. 3A] and the number of epileptiform discharges after PTZ administration [$F(6,22)= 3.62$; $p<0.05$; Fig. 3B].

Figure 4 shows a representative EEG recording before and after the administration of PTZ in an animal treated with (A) vehicle, (B) phenobarbital, (C) montelukast, (D) phenobarbital + montelukast or (E) phenobarbital + montelukast + LTD₄. The electrographic pattern of the seizures presented by animals injected with LTD₄ (200 pmol) was very similar to that presented by animals treated only with vehicle plus PTZ. The expanded waves from the EEG recording outlined by the box are shown in A', B', C', D' and E', confirming, electrographically, that LTD₄ antagonized the effect of montelukast. Statistical analysis of wave decomposition by FFT revealed that none of the treatments altered the power spectrum analysis in our experimental conditions (Figure 5).

The effect of equieffective doses of phenobarbital, montelukast and phenobarbital plus montelukast on the number of crossing responses of mice are shown in Figure 6. Statistical analysis (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test) showed that only phenobarbital (0.74 μ mol, p.o.) reduced the spontaneous locomotor activity [$H(3)=10.81$; $p<0.05$ – Fig. 6] and that animals treated with phenobarbital plus montelukast behaved very similarly to those mice treated with vehicle.

4 Discussion

The current study shows that montelukast, a CysLT₁ receptor inverse agonist, synergistically enhances the anticonvulsant effect of phenobarbital in an acute chemically-induced seizure model, in mice. Moreover, such a synergism is blocked by LTD₄, a CysLT₁ receptor agonist.

Most of the studies investigating the role of arachidonic acid-derivatives on seizures have elected prostaglandins as the main target [4, 9, 26, 27], for several reasons. Probably the most obvious one is because prostaglandins are the ultimate fever mediator, and there is a long known association between fever and seizures [18, 28, 29]. These initial findings have led prostaglandin research to show that the

activation of selected prostaglandin receptors facilitate or inhibit seizures, depending on activated intracellular messengers, revealing novel possible targets for AED development [4, 9, 30]. Accordingly, a number of studies have investigated the role of cyclooxygenases (COX) in seizures, finding conflicting results [31-35]. In fact, the prostaglandin synthesis process, *per se*, has been suggested to contribute for increased cell excitability [36-38]. Reactive byproducts produced during the synthesis of prostaglandins through COX cause oxidative stress and have also been suggested to increase seizure susceptibility [39-41]. Moreover, elegant electrophysiological studies provided evidence that endogenous prostaglandins, particularly PGE₂, dynamically regulate membrane excitability, temporal summation, and synaptic efficiency in hippocampal pyramidal neurons [42].

Recent pharmacological evidence, however, suggests that non-prostanoid arachidonic acid-derived molecules, such as leukotrienes, produced via LOX, also play a role in seizures [13]. The early findings by Palmer and colleagues (1981) that LTD₄ increases neuronal firing rate together with the demonstration that montelukast and a putative synthetic LTD₄ pathway inhibitor dose-dependently suppress the development of kindled seizures, as well as pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures, support this view [16]. Moreover, Lenz and colleagues (2014) have shown that montelukast not only has anticonvulsant effect but also protects against BBB disruption and leukocyte infiltration in a cannula-lesioned cortical area, suggesting that montelukast also decreases neuroinflammation and/or exposure to blood-borne elements [15]. It is well known that areas of focal hyperexcitability can develop in the brain after trauma, infection, ischemia, and excitotoxicity, probably due to neuroinflammation and/or exposure to blood-borne elements [43-49]. Furthermore, pranlukast treatment protects against global cerebral ischemia in rats and inhibits the expression of NMDA-NR2A receptor [50, 51]. Therefore, existing experimental and clinical evidence suggest that CysLT₁ receptor modulators that have been used in the clinics to treat diseases as asthma [52], may be of a value to treat epilepsy, as adjuvant therapy. The current study not only agrees with this view but also extends these findings by showing that there is an important pharmacological synergism between a classic AED and a CysLT₁ receptor inverse agonist.

The study of the interaction between phenobarbital and montelukast was performed by isobolographic analysis, a quantitative measure of dose-effect relationship of each drug alone and combined, which allows determining whether a

given drug combination results in an additive, antagonistic or a synergic effect. Montelukast synergistically increased the anticonvulsant effect of phenobarbital at 1:1 fixed ratios in such a way that the doses of drug combinations required to decrease the latency to tonic-clonic PTZ-induced seizures and EEG amplitude were much lower than the equi-effective doses of each drug alone.

It is well known that pharmacokinetic interactions, such as competition for plasma protein binding and/or regulation of membrane transporters, may result in enhanced effects of simultaneously administered drugs [53-56]. In the current study we avoided these possible pharmacokinetic interactions by administering the drugs by different routes (i.c.v. and p.o.). Therefore, the currently observed synergism can not be attributed to a competition for plasma protein or increased blood-brain barrier transport, since montelukast was administered directly into the brain (i.c.v.). Moreover, it is also unlikely that the synergistic effect of montelukast and phenobarbital is due to a decreased metabolism of phenobarbital. First, because the amount of montelukast injected was very small, as it was administered by the i.c.v. route. Consequently, even if it redistributed from the brain, it would not significantly increase plasma levels or impair the metabolism of phenobarbital in the liver. Moreover, if montelukast increased brain levels of phenobarbital by any means, one would expect to observe a sedative effect. Instead, the association of montelukast and phenobarbital resulted in a huge decrease in the amount of the barbiturate necessary to decrease seizures and, consequently, the animals that received the combination of drugs did not present any sign of sedation. This is in full agreement with the view that application of a two-drug combination with synergistic effects may be beneficial due to the reduction of adverse effects, maintaining anticonvulsant activity [57]. In fact, a recent clinical study has shown that add-on therapy of AEDs used in the clinics with pranlukast, a CysLT₁ receptor antagonist, reduces seizure frequency in patients with intractable partial epilepsy [58]. According to this view, AED polytherapy based on mechanisms of action may enhance effectiveness [57]. However, given the incomplete knowledge of the pathophysiology of seizures and the exact mechanisms of action of AEDs, an empirical but rational approach for evaluating AED combinations may be of fundamental importance to identify suitable combinations. At last, it is worth pointing out that female animals were used in this study. Although a gender difference in the anticonvulsant effect of montelukast sounds unlikely because of the previously reported anticonvulsant effect of this

CysLT₁ antagonist in male mice [15], the current results shall be considered observing this methodological aspect.

5 Conclusion

Our findings reveal that montelukast, a CysLT₁ receptor inverse agonist, potentiates the anticonvulsant effect of phenobarbital on PTZ-induced seizures. This synergistic effect involves the CysLT₁ receptor, since LTD₄ reversed this effect. From the clinical standpoint, CysLT₁ antagonists seem to emerge as promising adjunct therapeutic agents in the treatment of refractory seizures. Notwithstanding, additional studies are necessary to evaluate the clinical implications of this work.

Acknowledgements: Financial support from CAFP/Capes (029/10), CAPES/PRODOC, CNPq, PIBIC/CNPq and DOCFIX/Fapergs and PROBIC/Fapergs. CFM is the recipient of a productivity fellowship of CNPq (304029/2010-6).

References

- [1] Falip M, Salas-Puig X, Cara C. Causes of CNS inflammation and potential targets for anticonvulsants. *CNS Drugs* 2013; 27(8):611-623.
- [2] Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(1):116-125.
- [3] Balosso S, Ravizza T, Aronica E, Vezzani A. The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures. *Exp Neurol* 2013; 247:267-271.
- [4] Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF. Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 2008; 152(4):1110-1118.
- [5] Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol* 2013; 244:11-21.

- [6] Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* 2013; 69:16-24.
- [7] Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang MS, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(1):17-25.
- [8] Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia* 2012; 60(8):1251-1257.
- [9] Mello CF, Oliveira MS. Commentary on Kaushik et al.: Prostaglandin D2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. Novel evidence supporting a role for prostanoid receptors in seizure control. *Exp Neurol* 2014; 257:157-161.
- [10] Simmet T, Tippler B. Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. *Brain Res* 1990; 515(1-2):79-86.
- [11] Kim HC, Jhoo WK, Bing G, Shin EJ, Wie MB, Kim WK, Ko KH. Phendione prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. *Brain Res* 2000; 874(1):15-23.
- [12] Dupre DJ, Le Gouill C, Gingras D, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Inverse agonist activity of selected ligands of the cysteinyl-leukotriene receptor 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309(1):102-108.
- [13] Rehni AK, Singh TG. Modulation of leukotriene D4 attenuates the development of seizures in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011; 85(2):97-106.
- [14] Liu X, Yang Z, Yin Y, Deng X. Increased expression of Notch1 in temporal lobe epilepsy: animal models and clinical evidence. *Neural Regen Res* 2014; 9(5):526-533.
- [15] Lenz QF, Arroyo DS, Temp FR, Poersch AB, Masson CJ, Jesse AC, Marafiga JR, Reschke CR, Iribarren P, Mello CF. Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. *Neuroscience* 2014; 277:859-871.

- [16] Palmer MR, Mathews WR, Hoffer BJ, Murphy RC. Electrophysiological response of cerebellar Purkinje neurons to leukotriene D4 and B4. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219(1):91-96.
- [17] Weaver DF, Pohlmann-Eden B. Pharmacoresistant epilepsy: unmet needs in solving the puzzle(s). *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 2:80-85.
- [18] Camfield CS, Camfield PR, Neville BG. Febrile Seizures In: *Epilepsy- a comprehensive textbook*, vol. 3. Philadelphia; 2008: 659.
- [19] Tallarida RJ. *Drug synergism and dose-effect analysis*. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC; 2000.
- [20] Paxinos G, Franklin KBJ. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4^a ed: Academic Press; 2012.
- [21] D'Ambrosio R, Hakimian S, Stewart T, Verley DR, Fender JS, Eastman CL, Sheerin AH, Gupta P, Diaz-Arrastia R, Ojemann J et al. Functional definition of seizure provides new insight into post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 2009; 132(Pt 10):2805-2821.
- [22] Lopez-Munoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005; 1(4):329-343.
- [23] Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer* 2011; 2(11):1003-1008.
- [24] Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989; 41(2):93-141.
- [25] Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 2002; 98(1-2):163-168.
- [26] Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:901902.
- [27] Takemiya T, Yamagata K. Intercellular Signaling Pathway among Endothelia, Astrocytes and Neurons in Excitatory Neuronal Damage. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4):8345-8357.

- [28] Choy M, Dube CM, Ehrenguber M, Baram TZ. Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 2014; 14(1 Suppl):15-22.
- [29] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005; 46(11):1724-1743.
- [30] Kaushik MK, Aritake K, Kamauchi S, Hayaishi O, Huang ZL, Lazarus M, Urade Y. Prostaglandin D(2) is crucial for seizure suppression and postictal sleep. *Exp Neurol* 2014; 253:82-90.
- [31] Akarsu ES, Ozdayi S, Algan E, Ulupinar F. The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction. *Epilepsy Res* 2006; 71(2-3):181-187.
- [32] Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, Toellner K, Miller DS, Potschka H. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol* 2008; 73(5):1444-1453.
- [33] Claycomb RJ, Hewett SJ, Hewett JA. Prophylactic, prandial rofecoxib treatment lacks efficacy against acute PTZ-induced seizure generation and kindling acquisition. *Epilepsia* 2011; 52(2):273-283.
- [34] Schlichtiger J, Pekcec A, Bartmann H, Winter P, Fuest C, Soerensen J, Potschka H. Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. *Br J Pharmacol* 2010; 160(5):1062-1071.
- [35] Toscano CD, Kingsley PJ, Marnett LJ, Bosetti F. NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *Neurotoxicology* 2008; 29(6):1114-1120.
- [36] Sang N, Zhang J, Chen C. PGE2 glycerol ester, a COX-2 oxidative metabolite of 2-arachidonoyl glycerol, modulates inhibitory synaptic transmission in mouse hippocampal neurons. *J Physiol* 2006; 572(Pt 3):735-745.
- [37] Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Dore S. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1-2):172-179.

- [38] Carlson NG, Rojas MA, Black JD, Redd JW, Hille J, Hill KE, Rose JW. Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP1 prostaglandin E2 receptor. *J Neuroinflammation* 2009; 6:5.
- [39] Baranano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20):10996-11002.
- [40] Tian J, Kim SF, Hester L, Snyder SH. S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30):10537-10540.
- [41] Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim WK, Ko KH, Bach JH, Hong JS, Yoneda Y, Kim HC. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int* 2011; 59(2):122-137.
- [42] Chen C, Bazan NG. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2005; 93(2):929-941.
- [43] van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007; 130(Pt 2):521-534.
- [44] Mannix R, Berglass J, Berkner J, Moleus P, Qiu J, Andrews N, Gunner G, Berglass L, Jantzie LL, Robinson S et al. Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2014:1-9.
- [45] Balta S, Aparci M, Demir M, Ozturk C, Celik T. Ischemia-modified albumin in patients with seizure. *Am J Emerg Med* 2014; 32(10):1282.
- [46] Singh RK, Joshi SM, Potter DM, Leber SM, Carlson MD, Shellhaas RA. Cognitive outcomes in febrile infection-related epilepsy syndrome treated with the ketogenic diet. *Pediatrics* 2014; 134(5):e1431-1435.
- [47] Esposito E, Cordaro M, Cuzzocrea S. Roles of fatty acid ethanolamides (FAE) in traumatic and ischemic brain injury. *Pharmacol Res* 2014; 86:26-31.

- [48] Zhang Q, Yuan L, Liu D, Wang J, Wang S, Gong Y, Liu H, Hao A, Wang Z. Hydrogen sulfide attenuates hypoxia-induced neurotoxicity through inhibiting microglial activation. *Pharmacol Res* 2014; 84:32-44.
- [49] Mango D, Barbato G, Piccirilli S, Panico MB, Feligioni M, Schepisi C, Graziani M, Porrini V, Benarese M, Lanzillotta A et al. Electrophysiological and metabolic effects of CHF5074 in the hippocampus: protection against in vitro ischemia. *Pharmacol Res* 2014; 81:83-90.
- [50] Ding Q, Wei EQ, Zhang YJ, Zhang WP, Chen Z. Cysteinyl leukotriene receptor 1 is involved in N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal injury in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(12):1526-1536.
- [51] Zhang LH, Wei EQ. Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on transient global cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(12):1241-1247.
- [52] Fogli S, Stefanelli F, Neri T, Bardelli C, Amoruso A, Brunelleschi S, Celi A, Breschi MC. Montelukast prevents microparticle-induced inflammatory and functional alterations in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 2013; 76:149-156.
- [53] Harder S, Thurmann P. Clinically important drug interactions with anticoagulants. An update. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30(6):416-444.
- [54] Hellum BH, Nilsen OG. In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-glycoprotein-mediated transport by trade herbal products. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(5):466-475.
- [55] He L, Wickremasingha P, Lee J, Tao B, Mendell-Harary J, Walker J, Wight D. Lack of effect of colesevelam HCl on the single-dose pharmacokinetics of aspirin, atenolol, enalapril, phenytoin, rosiglitazone, and sitagliptin. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 104(3):401-409.
- [56] Ogungbenro K, Aarons L. Physiologically based pharmacokinetic modelling of methotrexate and 6-mercaptopurine in adults and children. Part 2: 6-mercaptopurine and its interaction with methotrexate. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2014; 41(2):173-185.

- [57] Deckers CL, Czuczwar SJ, Hekster YA, Keyser A, Kubova H, Meinardi H, Patsalos PN, Renier WO, Van Rijn CM. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia* 2000; 41(11):1364-1374.
- [58] Takahashi Y, Imai K, Ikeda H, Kubota Y, Yamazaki E, Susa F. Open study of pranlukast add-on therapy in intractable partial epilepsy. *Brain Dev* 2013; 35(3):236-244.

TableTable 1 – Determination of ED₅₀ of PB and MTK for latency to PTZ-induced tonic-clonic seizures in mice

Drug(s)	ED₅₀ (95% CI)
PB	0.74 (0.52-1.04)
MTK	0.25 (0.11-0.54)
PB + MTK (add)	0.49 (0.42-0.57)
PB + MTK (mix)	0.06 (0.016-0.24) ^{***}

Data are presented as ED₅₀ and 95% confidence intervals (in μmol). PB (phenobarbital) (p.o.) and MTK (montelukast) (i.c.v.) were administered 30 min before PTZ (i.p.) in different amounts of fixed-ratio drug combinations (4 to 6 animals per group). Statistical analysis of obtained data was performed with Student's T test. See more details of the protocol in materials and methods section. ^{***}p < 0.001 vs. the respective additive ED₅₀ values

Figures

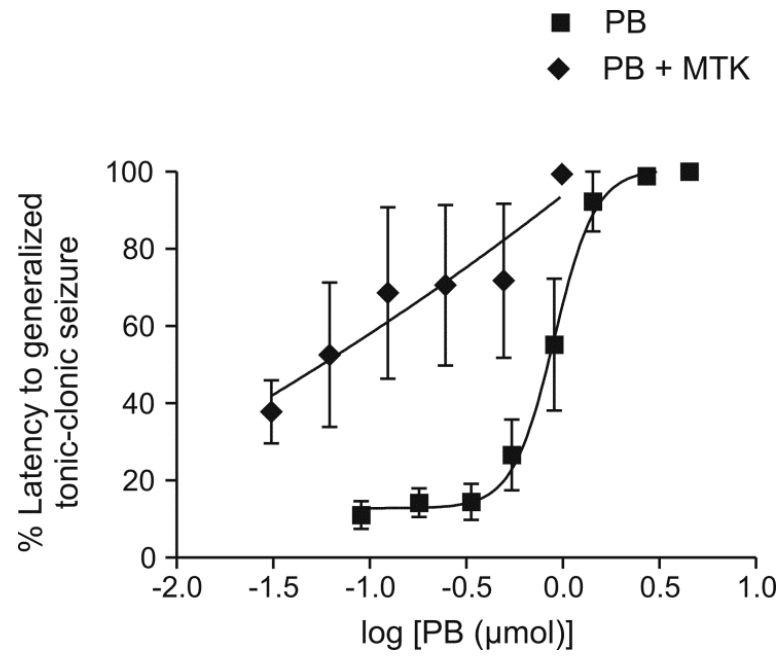


Figure 1 – Dose effect curve of phenobarbital (PB) and the combination of montelukast (MTK) plus phenobarbital (PB) for latency to PTZ-induced tonic-clonic seizures in mice. Data expressed as mean and S.E.M. for n=4-6 in each group.

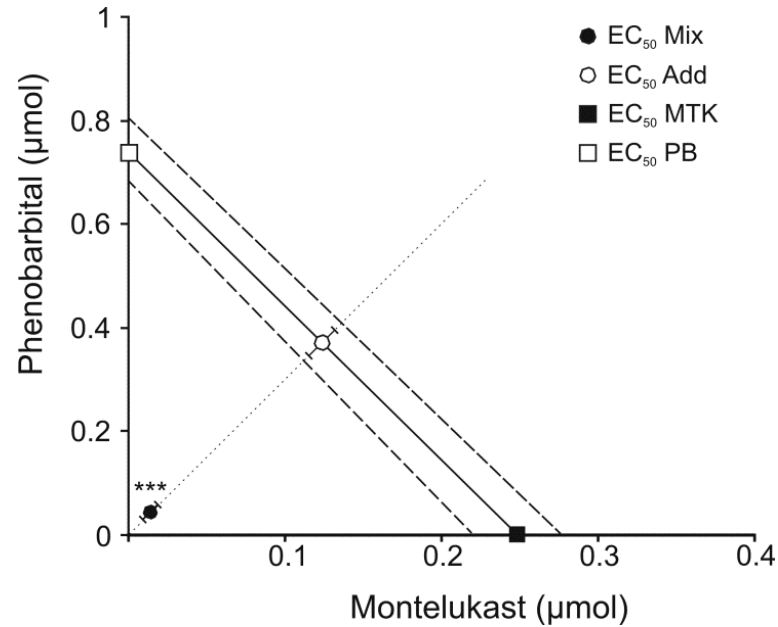


Figure 2 – Isobologram showing the calculated additive points for a mixture having 1:1 proportion of doses of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) as their individual potencies at 50% effect level (ED_{50}) against PTZ-induced tonic-clonic seizure. The ED_{50} values for MTK (0.25 μmol - closed square point) and PB (0.74 μmol – open square point) are placed on the graph, on X- and Y-axes, respectively. The isobole of additivity is shown as a solid line connecting these two points. Dashed lines are the theoretically additive standard error. The points on the additive isobole correspond to theoretical isobole for additivity, $ED_{50\text{add}}$ (open circle point), and the points below correspond to the experimentally $ED_{50\text{mix}}$ (closed circle point), values, in a proportion of drugs in a fixed ratio that produced a 50% effect. Data are expressed as mean and S.E.M. for $n=4-6$ in each group.*** $p<0.005$

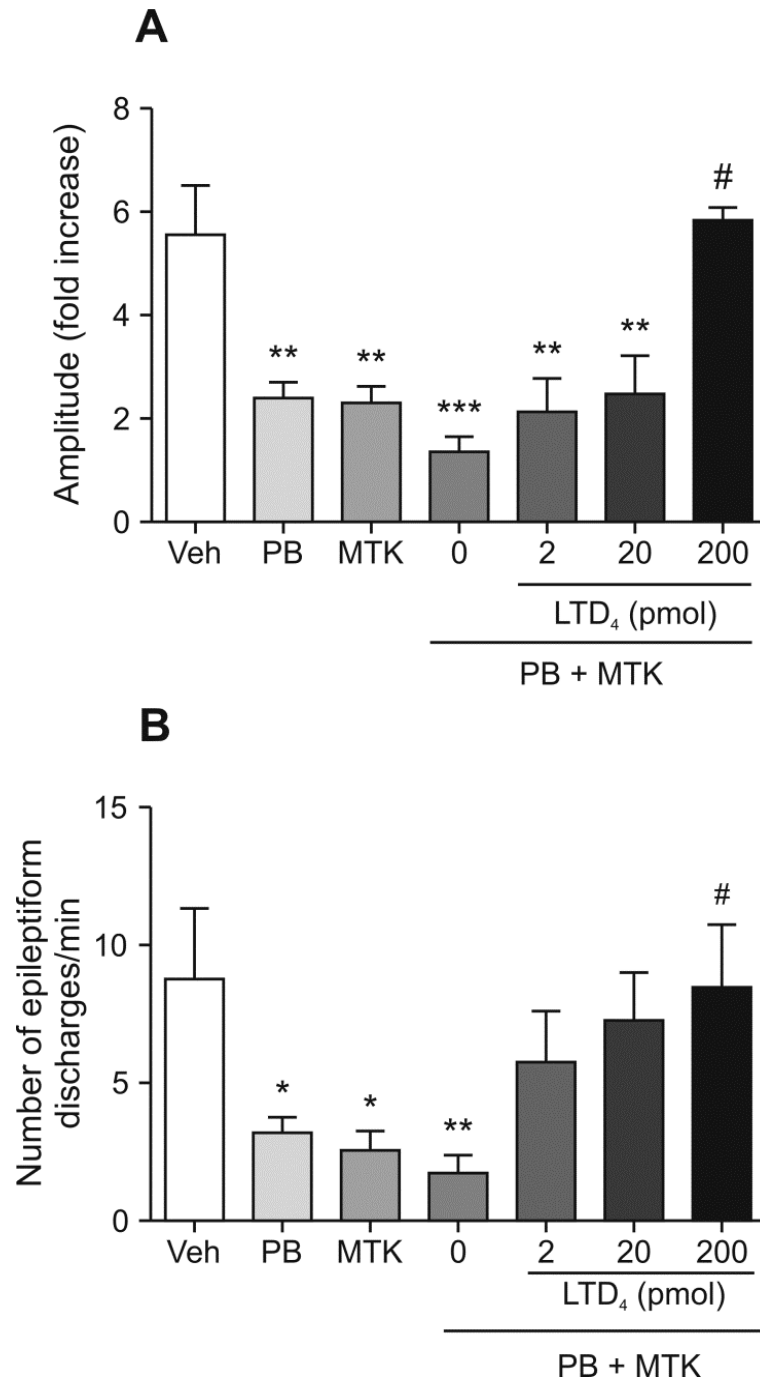


Figure 3 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on PTZ-induced seizure. Electrocardiogram recordings in the parietal cortex in both hemispheres of animals treated with the doses corresponding to their respective ED_{50} (or ED_{50mix}) as follows: PB (0.74 μmol , p.o.), MTK (0.25 μmol , i.c.v.), combination of PB (0.04 μmol , p.o.) + MTK (0.02 μmol , i.c.v.) and LTD_4 . (A) Fold increase of amplitude of ECG recordings relative to baseline post PTZ administration (B) Number of epileptiform discharges post-PTZ administration relative to baseline. Data were analyzed by one way ANOVA followed with Bonferroni's multiple comparison test and expressed as mean + S.E.M. for $n=4-5$ in each group. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, respectively; when compared with vehicle. # $p<0.05$ when compared with PB + MTK.

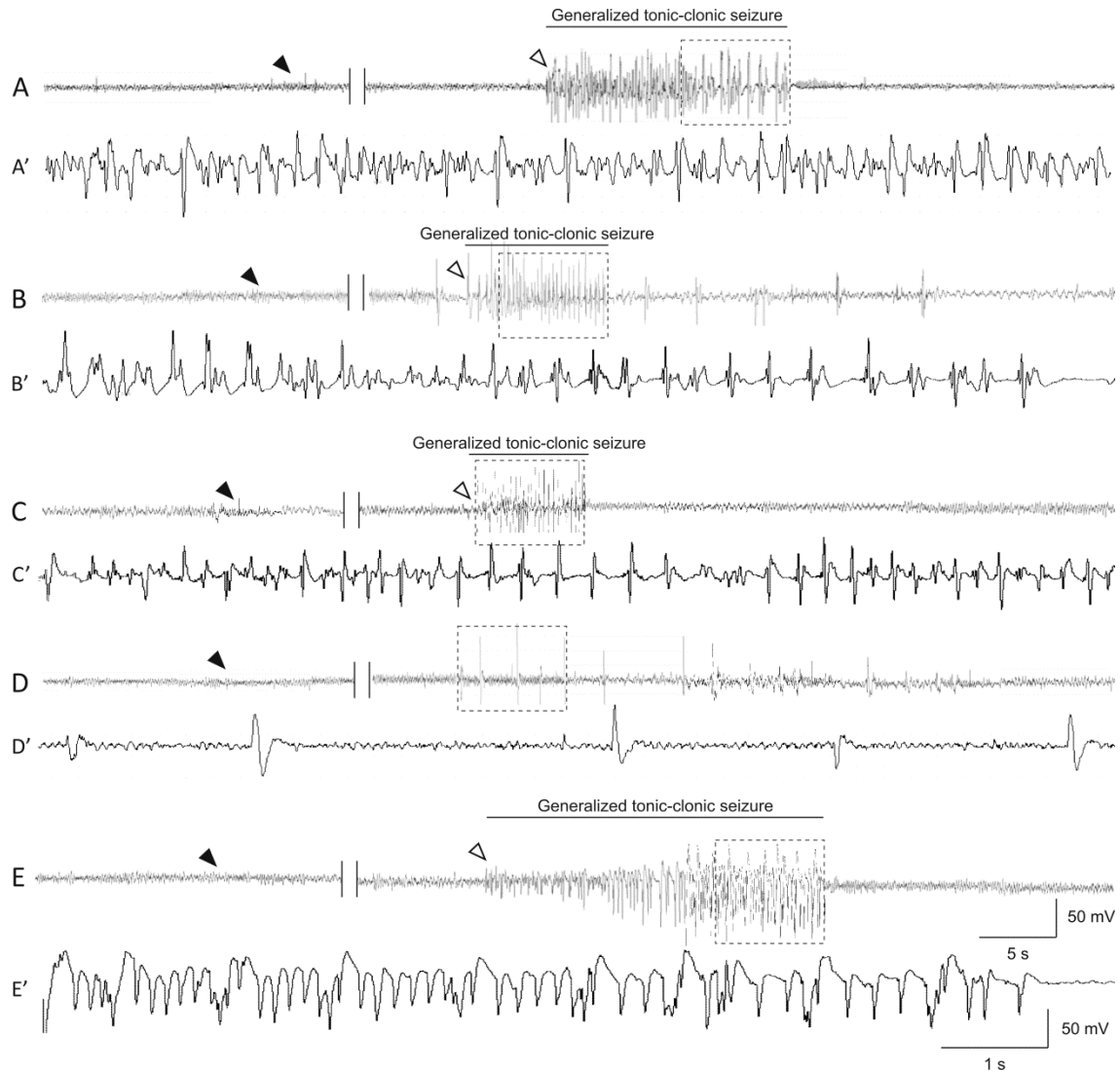


Figure 4 – Representative EEG electrocorticographic recordings of the right cerebral cortex before and after PTZ injection of animals injected with: (A) vehicle, (B) PB, (C) MTK, (D) PB + MTK or (E) PB + MTK + LTD₄. The expanded wave forms from the EEG recordings outlined by the boxes are shown in A', B', C', D' and E'. The black arrowhead indicates PTZ injection, whereas the white arrowhead indicates the onset of EEG the pattern associated with generalized tonic-clonic seizures

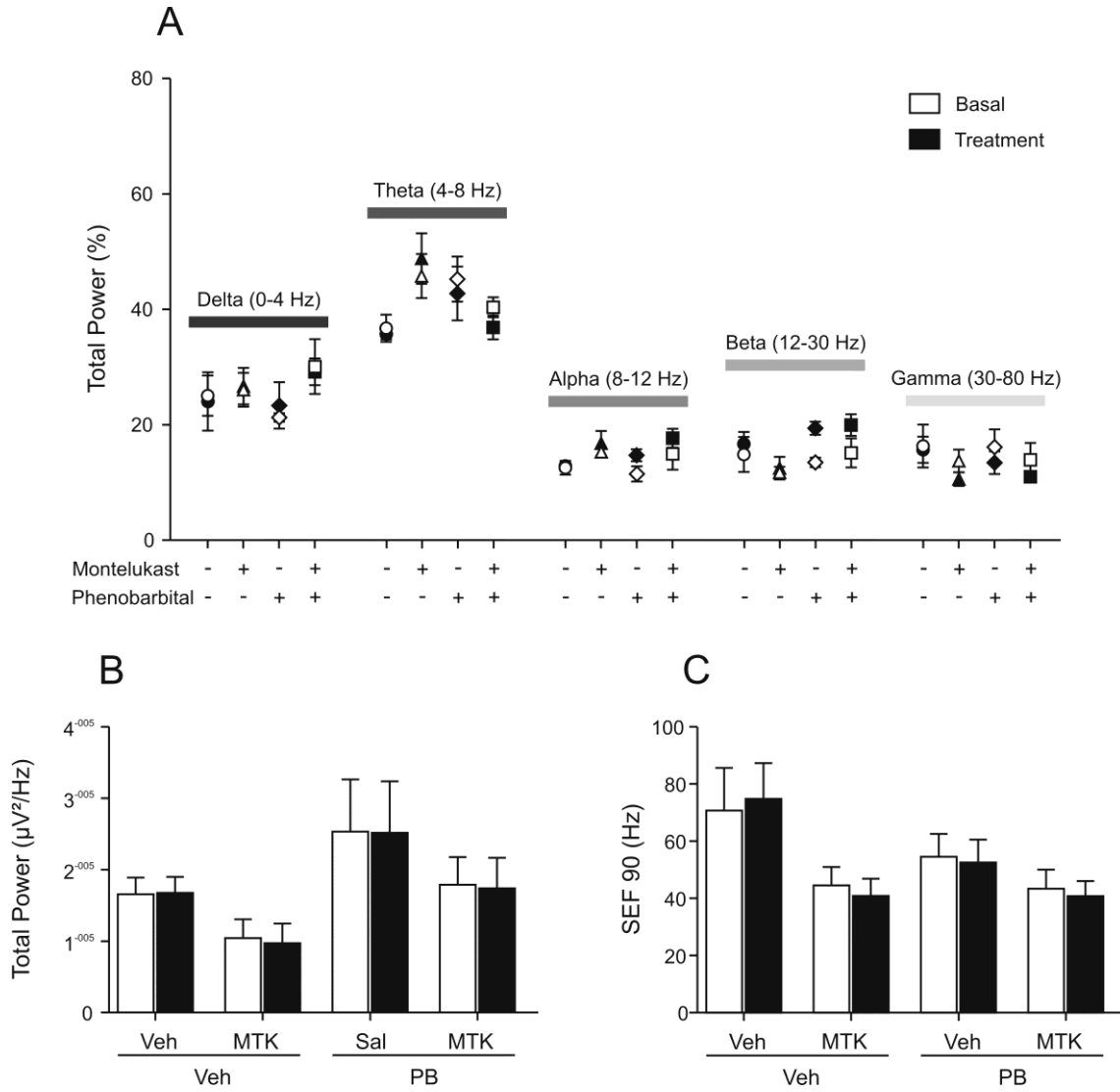


Figure 5 – Power spectrum analysis of EEG. Basal (no treatment), MTK, PB and MTK+PB treatments, expressed as relative values in decomposed waves (A); Power spectrum analysis of total range frequency (0.1-80 Hz), expressed as absolute values (B) 90% Spectral Edge Frequency (SEF90), expressed in frequency domain (C). Data are expressed as mean and S.E.M. for n=4-5 per group.

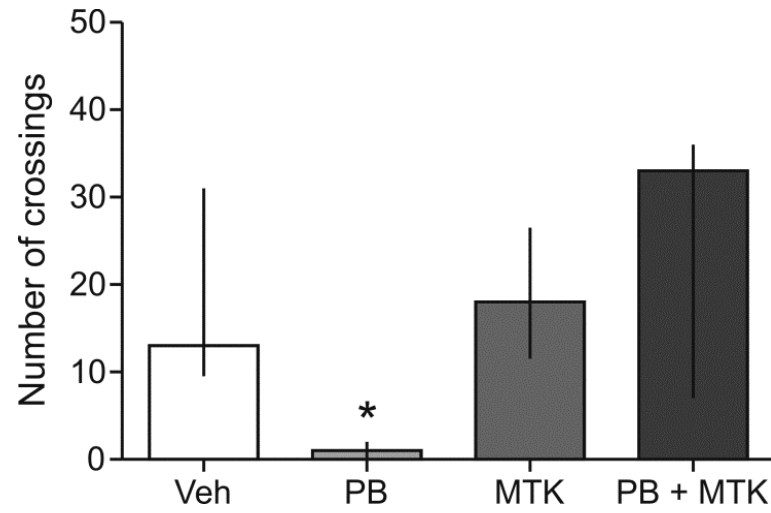


Figure 6 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on spontaneous locomotor activity. Number of crossings was analyzed by Kruskal-Wallis followed with Dunn's multiple comparison test and is expressed as median \pm interquartile range, for $n=4-5$ in each group. * $p<0.05$ compared with all other groups.

4.2 Manuscrito

MONTELUKAST DECREASES SEIZURES IN PTZ-KINDLED MICE

Juliana Fleck, Fernanda Rossatto Temp; Joseane Righes Marafiga, Ana Cláudia Jesse, Laura Hautrive Milanesi, Leonardo Magno Rambo, Carlos Fernando Mello,

Manuscrito submetido ao periódico

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Brazilian Journal

of medical and biological research

Montelukast decreases seizures in PTZ-kindled mice

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fleck, Juliana; Unifra, Pharmacy; UFSM, Physiology and Pharmacology Temp, Fernanda; UFSM, Physiology and Pharmacology Marafiga, Joseane; UFSM, Physiology and Pharmacology Jesse, Ana; UFSM, Physiology and Pharmacology Milanesi, Laura; UFSM, Physiology and Pharmacology Rambo, Leonardo; UFSM, Physiology and Pharmacology Mello, Carlos; Universidade Federal de Santa Maria, Physiology and Pharmacology
Keywords:	montelukast, CysLT1R, CysLT2R, seizure, PTZ, kindling
Special Sections:	Biomedical Sciences/Neurosciences and Behavior

Montelukast decreases seizures in PTZ-kindled mice

J. Fleck^{1,2,3}, F. R. Temp¹, J. R. Marafiga¹, A. C. Jesse¹, L. H. Milanesi¹,
L. M. Rambo¹ and C. F. Mello^{1*}

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

² University Hospital of Santa Maria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Pharmacy Department, Center of Health Sciences, Franciscan University Center, RS, Brazil

Abstract

Although cysteinyl leukotrienes (CysLTs) have been implicated in seizures and kindling, no study has investigated whether CysLT receptor antagonists decrease seizures in kindled animals, or whether CysLT receptor expression is altered by kindling. In this study we investigated whether the CysLT₁ inverse agonist montelukast and a classical anticonvulsant, phenobarbital, decrease seizures in PTZ-kindled mice and CysLT receptor expression. Montelukast (10 mg/kg; s.c.) and phenobarbital (20 mg/kg, s.c.) increased the latency to generalized seizures in kindled mice. Montelukast increased CysLT₁ immunoreactivity only in non-kindled PTZ-challenged mice. Interestingly, PTZ challenge decreased CysLT₂ immunoreactivity only in kindled mice. CysLT₁ antagonists seem to emerge as promising adjunct therapeutic agents in the treatment of refractory seizures. Notwithstanding, additional studies are necessary to evaluate the clinical implications of this work.

Key words: montelukast, CysLT₁R; CysLT₂R, seizure, PTZ, kindling.

Running title: Montelukast decreases seizures in PTZ-kindled mice

*Corresponding author. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil

Tel: +55 55 3220 8870; fax: + 55 55 3220 8241

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

1 Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by recurrent seizures due to excessive discharge of cerebral neurons and by emotional and cognitive dysfunction (FISHER, 2014). This disorder affects approximately 50 million people worldwide and at least 30% of patients remain refractory despite the use of antiepileptic drug (SCHMIDT; LOSCHER, 2005). Considering the elevated number of patients who do not respond to available treatment, it is essential to search for novel therapeutic targets and identify seizure mechanisms.

Several lines of evidence support a role for inflammation in epilepsy. Experimental and clinical studies have shown that seizures induce brain inflammation and that recurrent seizures perpetuate chronic inflammation (VEZZANI; GRANATA, 2005; SHIMADA et al., 2014). In fact, arachidonic acid (AA) is released from membrane phospholipids during seizures and oxidized by COX (cyclooxygenase) and LOX (lipoxygenase), generating AA proinflammatory products, the so called “uncontrolled arachidonic acid cascade” (PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006). These downstream products include prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. Accordingly, prostaglandin and leukotriene B₄ and C₄ levels are increased in the hippocampus of epileptic patients and in the cerebrospinal fluid of children with febrile seizures (LOSCHER; SIEMES, 1988; MATSUO et al., 1996). In addition, kainic acid-induced seizures are associated with increased brain levels of leukotrienes and PGF_{2α} in the cortex, hippocampus and hypothalamus of rats (SIMMET; TIPPLER, 1990). As expected, a role for leukotriene receptors, particularly of the CysLT₁ subtype, has been proposed in seizure/epilepsy (SIMMET; TIPPLER, 1990; REHNI; SINGH, 2011; LENZ et al., 2014; FLECK et al., 2015). While LTD₄ (a CysLT₁ receptor agonist) facilitates, intracerebroventricularly injected montelukast (a

CysLT₁ receptor inverse agonist) decreases PTZ-induced seizures. In addition, i.c.v. montelukast prevents PTZ-induced BBB disruption and leukocyte infiltration (LENZ et al., 2014). At last, it has been recently shown that montelukast (i.c.v.) potentiates the anticonvulsant effect of phenobarbital on PTZ seizures and decreases sedation, a major side effect of phenobarbital (FLECK et al., 2015). However, it is still unknown whether CysLT₁ receptor antagonism decreases seizures in animals with established seizure susceptibility, such as kindled animals. Therefore, the aim of the current investigation was to evaluate whether montelukast (a CysLT₁ inverse agonist) decreases seizures in PTZ-kindled mice. In addition, we evaluated whether pharmacological treatment, kindling and challenge with PTZ alter CysLT₁ and CysLT₂ receptor immunoreactivity in the cerebral cortex of these animals.

2 Material and Methods

2.1 Animals

Young male Swiss mice (25-28 g, 42 days old) from the Animal House of Federal University of Santa Maria were used. Animals were housed 12 to a plexiglas cage (35 cm L x 52 cm W x 17 cm H) under controlled light and environmental conditions (12:12-h light/dark cycle, 22 ± 1°C, 55% relative humidity). Food (Supra, Santa Maria, Brazil) and drinking water were provided *ad libitum*. Behavioral tests were carried out during the light phase of the cycle, from 9:00 to 17:00 h, in accordance with the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). The protocols were designed aiming to reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering, and were approved by the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria (authorization number: 084/2013).

2.2 Reagents

PTZ was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), LTD₄ and montelukast were from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and phenobarbital was from

Cristália Pharmaceutical Co. (São Paulo, Brazil). PTZ was dissolved in isotonic saline (0.9% NaCl). Phenobarbital and montelukast were dissolved in 0.5% dimethyl sulfoxide and sterile apyrogenic saline containing 10% propylene glycol. Fresh drug solutions were prepared immediately before use.

2.3 Kindling induction and seizure observation

Mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 0.9% NaCl (saline, 10 ml/kg) or PTZ (35 mg/kg) three times a week (Monday, Wednesday and Friday) for 5 weeks, followed by an application-free interval of one week. After each PTZ injection, the convulsive behavior was observed for 20 min and classified in the following stages, as described by Ferraro and colleagues (1999): stage 0, no behavioral change; stage 1, hypoactivity and immobility; stage 2, two or more isolated, myoclonic jerks; stage 3, generalized clonic convulsions, with preservation of righting reflex; and stage 4, generalized clonic or tonic-clonic convulsions with loss of righting reflex (FERRARO et al., 1999).

An animal was considered kindled when it presented stage 3 or stage 4 seizures in three consecutive sessions. The mean number of days to kindling was 11.2 ± 1.3 (mean \pm S.E.M.). Seventy three percent of the mice developed kindling, 20% did not and 7% died. Figure 1A and 1B shows the time-course for effectively induction of kindling.

The animals that reached kindling criterion were kept drug-free for one week and injected subcutaneously (s.c.) with montelukast (10 mg/kg, s.c.), phenobarbital (20 mg/kg, s.c.) or saline (10 mg/kg, s.c.). Sixty minutes thereafter the animals were challenged with PTZ (35 mg/kg, i.p.) or saline. Mice were video monitored for 20 min and the latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures were recorded. Mice were euthanized by decapitation at the end of the observation period. Cerebral cortex was quickly removed and stored at -80°C until processing. As expected, animals challenged with saline did not present seizures. Therefore, these animals were not included in the behavioral analysis. For each kindled animal, a saline-treated animal with the same number of injections was assigned to the same pharmacological treatment, and subjected to challenge with saline or PTZ. The full experimental design, with the twelve resulting groups, is shown in Figure 2 and Table 1, which also shows the frequency of seizures in the challenge session.

2.4 Western blot

The cerebral cortex was homogenized in a cold (4 °C) lysis buffer containing (in mM) 10 HEPES (pH 7.9), 10 KCl, 2 MgCl₂, 1 EDTA, 1 NaF, 1 phenylmethanesulphonyl fluoride, 10 β-glycerophosphate, 1 DTT and 2 sodium orthovanadate, and a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). The homogenates were centrifuged (12,700 x g) for 30 min at 4 °C and the supernatant (S1), denominated cytosolic fraction, was reserved for posterior processing. The pellet (P1) was resuspended in lysis buffer with 1% Triton-X, incubated for 15 min in ice, and centrifuged at 12,700 x g for 60 min at 4 °C. The supernatant (S2), containing the membrane fraction, was collected for later analysis and the pellet (P2) was stored at -80 °C. Protein concentration in the membrane fraction was measured by bicinchonic acid assay (BCA) using bovine serum albumin as standard. The proteins of the supernatants (20 μg of protein) were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA). Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-T (0.05% Tween 20 in Tris-borate saline) plus 5% non-fat milk at room temperature for 1 h, then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: rabbit anti-CysLT₁R (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) or goat anti-CysLT₂R (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). This procedure was followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 3 h. Blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and the band intensities were quantified by ImageJ 2.19 (NIH). In this experiments, β-actin (1:50000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) was used as an internal reference. The results were normalized for the control group (Saline-Saline-Saline) densitometry values and expressed as the relative amount of CysLT₁R, CysLT₂R. Proteins were probed in the same membranes after stripping with 0.5 M NaCl in 0.2 % SDS/TBS at 60 °C for 50 min.

2.5 Statistical analysis

Latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures were analyzed by two-way ANOVA for nonparametric data (Scharer-Ray-Hare test

followed by Mann Withney with Bonferroni's comparison test). These data are presented as median and interquartile range. Western blot were analyzed by a factorial 2 (saline or PTZ – “kindling”) × 3 (saline, montelukast or phenobarbital – “treatment”) × 2 (saline or PTZ – “challenge”) ANOVA followed by Bonferroni's test, and are presented as mean and S.E.M. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Seizure evaluation

Figure 3 shows the effect of montelukast (10 mg/kg, s.c.) and phenobarbital (20 mg/kg, s.c.) on PTZ-induced seizures (35 mg/kg, i.p.), measured as the latency to myoclonic jerk (A) and latency to generalized tonic-clonic seizures (B). Statistical analysis revealed that phenobarbital increased the latency to myoclonic jerks in kindled and non-kindled animals [$H(2) = 19.3$; $p < 0.01$]. Statistical analysis of latency to generalized seizures revealed that phenobarbital and montelukast increased the latency to generalized seizures in kindled animals [$H(2) = 19.0$; $p < 0.01$].

3.2 Western blot analysis

Figures 4A and 4B show the effect of kindling, pharmacological treatment (saline, montelukast or phenobarbital) and challenge with PTZ (or saline) on CysLT₁ and CysLT₂ receptor immunoreactivity in the cerebral cortex, respectively. Statistical analysis revealed a significant kindling (saline or PTZ) by treatment (saline, montelukast or phenobarbital) by challenge (saline or PTZ) interaction [$F(2,38) = 3.71$; $p = 0.034$; $\eta^2 = 0.16$] for CysLT₁ (Fig. 4A). *Post hoc* analysis revealed that while PTZ challenge reduced CysLT₁R immunoreactivity in non-kindled animals that received saline, it increased CysLT₁R immunoreactivity in non-kindled mice that received montelukast. Pharmacological treatment and PTZ challenge did not alter CysLT₁ receptor immunoreactivity in the cortex of PTZ-kindled mice.

Statistical analysis of CysLT₂ receptor immunoreactivity data revealed a significant kindling (sal or PTZ) by challenge (sal or PTZ) interaction [$F(1,38) = 5.81$;

$p=0.021$; $\eta^2=0.13$; Fig. 6B]. *Post hoc* analysis revealed that PTZ challenge decreased CysLT₂ immunoreactivity in kindled mice.

4 Discussion

In this study we showed that montelukast and phenobarbital decrease seizures in chemically-kindled mice. Montelukast administration increased CysLT₁ immunoreactivity only in non-kindled PTZ-challenged mice. Interestingly, PTZ challenge decreased CysLT₂ immunoreactivity only in kindled mice.

The current findings are in agreement with the current view that CysLT₁ inverse agonists decrease seizures (LENZ et al., 2014; FLECK et al., 2015) and extends previous data from Rehni and Singh (2011) (REHNI; SINGH, 2011) who have shown that systemic montelukast impairs kindling induction with PTZ. It has been recently shown that the CysLT₁ inverse agonist montelukast synergistically increases the anticonvulsant action of phenobarbital against pentylentetrazole-induced seizures. Moreover, LTD₄, a cysteinyl leukotriene, reverses the effect of montelukast (FLECK et al., 2015). In fact, epilepsy is associated with increased levels of inflammatory mediators in the brain, including leukotrienes, which can be produced by neurons, glia, and endothelial cells in the blood–brain barrier (BBB) (SIMMET; PESKAR, 1990; FARIAS et al., 2007). BBB dysfunction may result from brain insults such as status epilepticus or traumatic brain injury (VAN VLIET et al., 2007), and current evidence suggests that it may facilitate epileptogenesis or even aggravate the epileptic condition (HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012). Increased BBB permeability can persist for several weeks, months or even years and this may contribute to enhanced excitability, possibly by brain inflammation (VAN VLIET; ARONICA; GORTER, 2015). In line with this view, single (NITSCH; KLATZO, 1983) and repeated administration of chemoconvulsant agents, such as PTZ, enhance BBB permeability (GURSES et al., 2009). The brain areas most affected by PTZ-induced BBB disruption are the hypothalamus and cerebellum (NITSCH; KLATZO, 1983). Neutrophils that have breached the blood-brain barrier can lead to the immediate synthesis of cysteinyl leukotrienes (CysLTs). These pro-inflammatory mediators derived from the arachidonic acid 5-lipoxygenase pathway (SINGH et al., 2010) are involved in various diseases including inflammation following asthma,

cerebral ischemia and brain trauma (SAMUELSSON, 1983; CORSER-JENSEN et al., 2014; SAAD et al., 2015). CysLTs significantly increase after fluid percussion-induced brain injury and are detected as early as 10 minutes after injury and continue to rise until an hour (DHILLON; DOSE; PRASAD, 1996; FARIAS et al., 2009).

Despite convincing evidence suggesting that CysLT₁R antagonism maintains BBB integrity (KIM, 2009), a possible mechanism of seizure protection, pharmacological data provided by Lenz and colleagues (2014) (LENZ et al., 2014) indicate that additional mechanisms may underlie the anticonvulsant effect of montelukast. In line with this view, Palmer and colleagues (1981) have shown that LTD₄ increases the firing rate of Purkinje cells in vivo (PALMER et al., 1981), suggesting an excitatory role for this lipid mediator.

There are two aspects that are particularly significant from the translational point of view. The first is that the systemic administration of montelukast decreased seizures in kindled mice. The second is that montelukast is currently used in the clinics to treat asthma (BUSH, 2015). Therefore, concerns about montelukast toxicity in humans or the need for unusual routes of administration (usually i.c.v. in preclinical studies) that could limit its use in the clinics do not apply (LENZ et al., 2014; FLECK et al., 2015). In fact, previous studies have shown that the acute systemic administration of montelukast does not decrease seizures (REHNI; SINGH, 2011) in mice. This is in accordance with unpublished data from our group and other studies that systemic montelukast does not prevent PTZ-induced seizures in mice and the view that montelukast and pranlukast cross the BBB poorly. Therefore, it seems that the anticonvulsant effect of montelukast depends on previous BBB disruption, which occurs in both kindling and epilepsy. This is full agreement with the study that has shown that pranlukast increases the anticonvulsant efficacy of a number of classic anticonvulsants in patients with intractable partial epilepsy (TAKAHASHI et al., 2013).

In this study we also showed that while PTZ challenge decreases, montelukast increases CysLT₁R immunoreactivity in non-kindled mice. These findings are, to some extent, similar to the findings of Dupré and colleagues (2004) (DUPRE et al., 2004) who have shown that while montelukast, MK571 and zafirlukast (inverse agonists of CysLT₁R) increase, LTD₄ decreases cell surface receptor expression in COS-7 cells. Agonist binding to a G-protein coupled receptor enables receptor phosphorylation and interaction with beta-arrestin, leading to the sequestration of the receptor from the cell surface (GAINETDINOV et al., 2004;

SHENOY; LEFKOWITZ, 2011) making it available to proteolytic cleavage. Accordingly, inverse agonists may stabilize active receptor on the cell surface and interfere with the internalization process (DUPRE et al., 2004). Although we did not specifically assess the membrane surface content of CysLT₁ receptors, it is reasonable to suppose that LTD₄ decreased total CysLT₁ immunoreactivity by facilitating receptor internalization and proteolysis. In line with this view, Li and colleagues (2001) (LI et al., 2001) have shown that only inverse agonists could block internalization and down-regulation of opioid receptors. In addition, as expected, montelukast did not alter CysLT₂ receptor immunoreactivity, indicating a selectivity of the inverse agonist towards CysLT₁ receptors. It is important to point out that neither the anticonvulsant effect of montelukast nor the anticonvulsant effect of phenobarbital depended on alterations in CysLT₁ immunoreactivity, because CysLT₁ immunoreactivity was not altered in kindled animals.

Differently from CysLT₁ receptor, PTZ-induced challenge decreased CysLT₂ receptor immunoreactivity only in kindled animals. These results suggest that kindling may cause distinct effects on the response of CysLT₁ and CysLT₂ receptors to PTZ challenge. Since montelukast-induced effects on CysLT₁ immunoreactivity were also impaired in kindled animals, one might propose that kindling impairs CysLT₁, but facilitates CysLT₂ adaptive responses. Interestingly, chemical kindling increases NR2A subunit mRNA in the hippocampus, γ 2 subunit of GABA_A receptor mRNA in the piriform cortex (AHMADIRAD et al., 2014) and GABA_B receptor binding of whole brain (GETOVA; FROESTL; BOWERY, 1998). These neurochemical alterations may reflect the neuronal loss and synaptic reorganization that occurs in animals kindled by the systemic administration of PTZ (FRANKE; KITTNER, 2001; PAVLOVA et al., 2006). These alterations are accompanied by an increase in the immunoreactivity of glial fibrillary acid protein, a marker of astrocytes (FRANKE; KITTNER, 2001), suggesting reactive gliosis. In addition to neuronal cell loss and gliosis, PTZ kindling induces mossy fiber sprouting (GOLARAI; CAVAZOS; SUTULA, 1992) and sprouting in CA1 and the subiculum of the rats (CAVAZOS; JONES; CROSS, 2004). However, kindling itself did not alter CysLT receptor immunoreactivity in our experimental conditions. Given the multiplicity of cellular alterations observed in this model, further experiments, designed to study the differential expression of CysLT receptors in different cell types along kindling and their internalization dynamics, have to be

performed in order to clarify how CysLT receptors are affected by kindling and whether they play a role in seizure facilitation.

Acknowledgements

Financial support from CAFP/Capes (029/10), CAPES/PRODOC, CNPq, PIBIC/CNPq and DOCFIX/Fapergs and PROBIC/Fapergs. CFM is the recipient of a productivity fellowship of CNPq (307812/2014-6).

References

1. Fisher RS. Final comments on the process: lae definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:492-493
2. Schmidt D, Loscher W. Drug resistance in epilepsy: Putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005;46:858-877
3. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005;46:1724-1743
4. Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm* 2014;2014:901902
5. Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in cns: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 2006;52:201-243
6. Loscher W, Siemes H. Increased concentration of prostaglandin e-2 in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. *Epilepsia* 1988;29:307-310
7. Matsuo M, Hamasaki Y, Masuyama T, Ohta M, Miyazaki S. Leukotriene b4 and c4 in cerebrospinal fluid from children with meningitis and febrile seizures. *Pediatr Neurol* 1996;14:121-124
8. Simmet T, Tippler B. Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. *Brain Res* 1990;515:79-86
9. Rehni AK, Singh TG. Modulation of leukotriene d4 attenuates the development of seizures in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85:97-106
10. Lenz QF, Arroyo DS, Temp FR, Poersch AB, Masson CJ, Jesse AC, Marafiga JR, Reschke CR, Iribarren P, Mello CF. Cysteinyl leukotriene receptor (cyslt) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. *Neuroscience* 2014;277:859-871
11. Fleck J, Marafiga JR, Jesse AC, Ribeiro LR, Rambo LM, Mello CF. Montelukast potentiates the anticonvulsant effect of phenobarbital in mice: An isobolographic analysis. *Pharmacol Res* 2015;94:34-41

12. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 1999;19:6733-6739
13. Simmet T, Peskar BA. Lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acid metabolism in the central nervous system: Biosynthesis and putative functions. *Pharmacol Res* 1990;22:667-682
14. Farias SE, Zarini S, Precht T, Murphy RC, Heidenreich KA. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in rat neuronal and glial cells. *J Neurochem* 2007;103:1310-1318
15. van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007;130:521-534
16. Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, tgfbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia* 2012;60:1251-1257
17. van Vliet EA, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol* 2015;38:26-34
18. Nitsch C, Klatzo I. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J Neurol Sci* 1983;59:305-322
19. Gurses C, Ekizoglu O, Orhan N, Ustek D, Arican N, Ahishali B, Elmas I, Kucuk M, Bilgic B, Kemikler G, Kalayci R, Karadeniz A, Kaya M. Levetiracetam decreases the seizure activity and blood-brain barrier permeability in pentylenetetrazole-kindled rats with cortical dysplasia. *Brain Res* 2009;1281:71-83
20. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: Molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 2010;85:336-349
21. Samuelsson B. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983;220:568-575
22. Saad MA, Abdelsalam RM, Kenawy SA, Attia AS. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist protects against hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Neurochem Res* 2015;40:139-150
23. Corser-Jensen CE, Goodell DJ, Freund RK, Serbedzija P, Murphy RC, Farias SE, Dell'Acqua ML, Frey LC, Serkova N, Heidenreich KA. Blocking leukotriene synthesis attenuates the pathophysiology of traumatic brain injury and associated cognitive deficits. *Exp Neurol* 2014;256:7-16
24. Farias S, Frey LC, Murphy RC, Heidenreich KA. Injury-related production of cysteinyl leukotrienes contributes to brain damage following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2009;26:1977-1986
25. Dhillon HS, Dose JM, Prasad MR. Regional generation of leukotriene c4 after experimental brain injury in anesthetized rats. *J Neurotrauma* 1996;13:781-789
26. Kim KS. Methods for treating or preventing brain infections. In: International application published under the patent cooperation treaty (pct) 2009;WO 2009/152454 A1
27. Palmer MR, Mathews WR, Hoffer BJ, Murphy RC. Electrophysiological response of cerebellar purkinje neurons to leukotriene d4 and b4. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;219:91-96

28. Bush A. Montelukast in paediatric asthma: Where we are now and what still needs to be done? *Paediatr Respir Rev* 2015;16:97-100
29. Takahashi Y, Imai K, Ikeda H, Kubota Y, Yamazaki E, Susa F. Open study of pranlukast add-on therapy in intractable partial epilepsy. *Brain Dev* 2013;35:236-244
30. Dupre DJ, Le Gouill C, Gingras D, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Inverse agonist activity of selected ligands of the cysteinyl-leukotriene receptor 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:102-108
31. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:107-144
32. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:521-533
33. Li J, Chen C, Huang P, Liu-Chen LY. Inverse agonist up-regulates the constitutively active d3.49(164)q mutant of the rat mu-opioid receptor by stabilizing the structure and blocking constitutive internalization and down-regulation. *Mol Pharmacol* 2001;60:1064-1075
34. Ahmadirad N, Shojaei A, Javan M, Pourgholami MH, Mirnajafi-Zadeh J. Effect of minocycline on pentylentetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. *Neurol Sci* 2014;35:571-576
35. Getova D, Froestl W, Bowery NG. Effects of gabab receptor antagonism on the development of pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Brain Res* 1998;809:182-188
36. Pavlova TV, Yakovlev AA, Stepanichev MY, Gulyaeva NV. Pentylentetrazol kindling in rats: Is neurodegeneration associated with manifestations of convulsive activity? *Neurosci Behav Physiol* 2006;36:741-748
37. Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylentetrazol-kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:291-303
38. Golarai G, Cavazos JE, Sutula TP. Activation of the dentate gyrus by pentylentetrazol evoked seizures induces mossy fiber synaptic reorganization. *Brain Res* 1992;593:257-264
39. Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and ca1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 2004;126:677-688

Table

Table 1 – Effect of montelukast and phenobarbital on seizure frequency induced by PTZ in kindled and non-kindled mice.

Group	Kindling	Treatment	Challenge	Seizure frequency
1	SAL	SAL	SAL	0/4
2	SAL	MTK	SAL	0/4
3	SAL	PB	SAL	0/4
4	SAL	SAL	PTZ	1/4
5	SAL	MTK	PTZ	1/4
6	SAL	PB	PTZ	0/4
7	PTZ	SAL	SAL	0/4
8	PTZ	MTK	SAL	0/4
9	PTZ	PB	SAL	0/4
10	PTZ	SAL	PTZ	6/6*
11	PTZ	MTK	PTZ	5/8
12	PTZ	PB	PTZ	1/6

Frequency of 3 or 4-stage seizure after challenge with saline or PTZ. Mice were chronically treated with saline or PTZ (kindling) and challenged with PTZ after pharmacological treatment (SAL, PB, MTK) (n=56). *p<0.05 compared with SAL-SAL-SAL group (Fisher's exact probability test). SAL (saline); PTZ (pentylenetetrazole); MTK (montelukast); PB (phenobarbital).

Figures

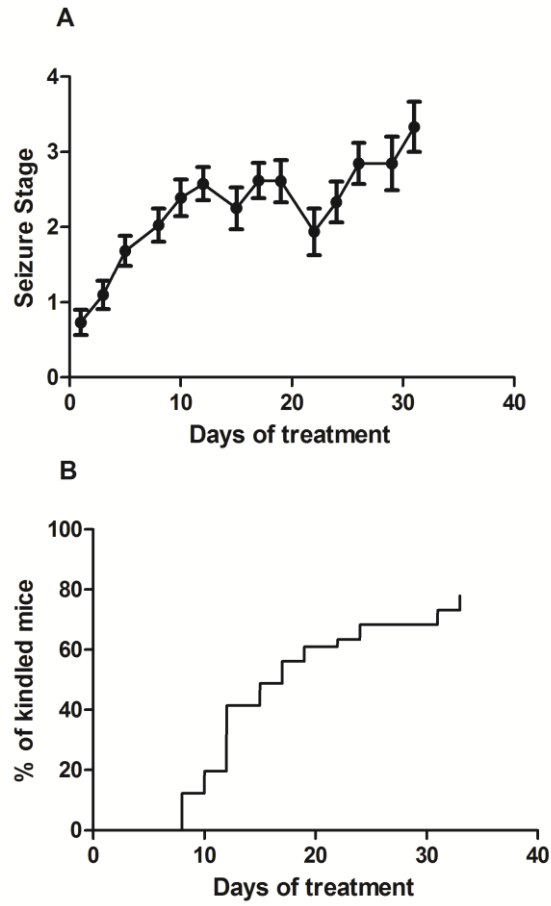


Figure 1 – Time-course for induction of kindling (n=32) after repeated PTZ (35 mg/kg, i.p.) administration. The results are expressed as the mean of seizure stage (A) and the cumulative percentage of the total number of kindled mice (B).

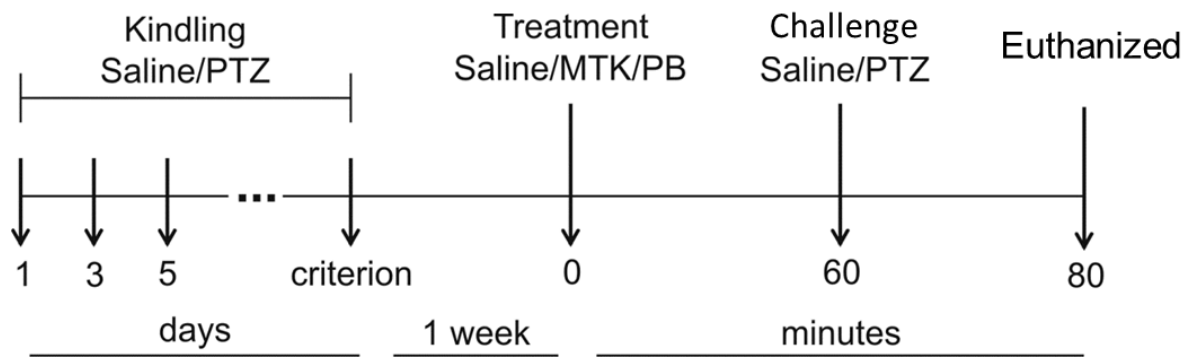


Figure 2 – Experimental protocol. Animals were injected with PTZ (35 mg/kg i.p.) on days 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 24, 26, 29, 31, 33 up to criterion. For each kindled mouse a saline-treated animal was performed. One week after kindling induction, mice were treated with saline, MTK (10 mg/kg, i.p.) or PB (20 mg/kg, i.p.), 60 min before challenge with PTZ (35 mg/kg, i.p.) or saline (i.p.). Animals were observed for 20 min and euthanized. PTZ (pentylentetrazole); MTK (montelukast); PB (phenobarbital).

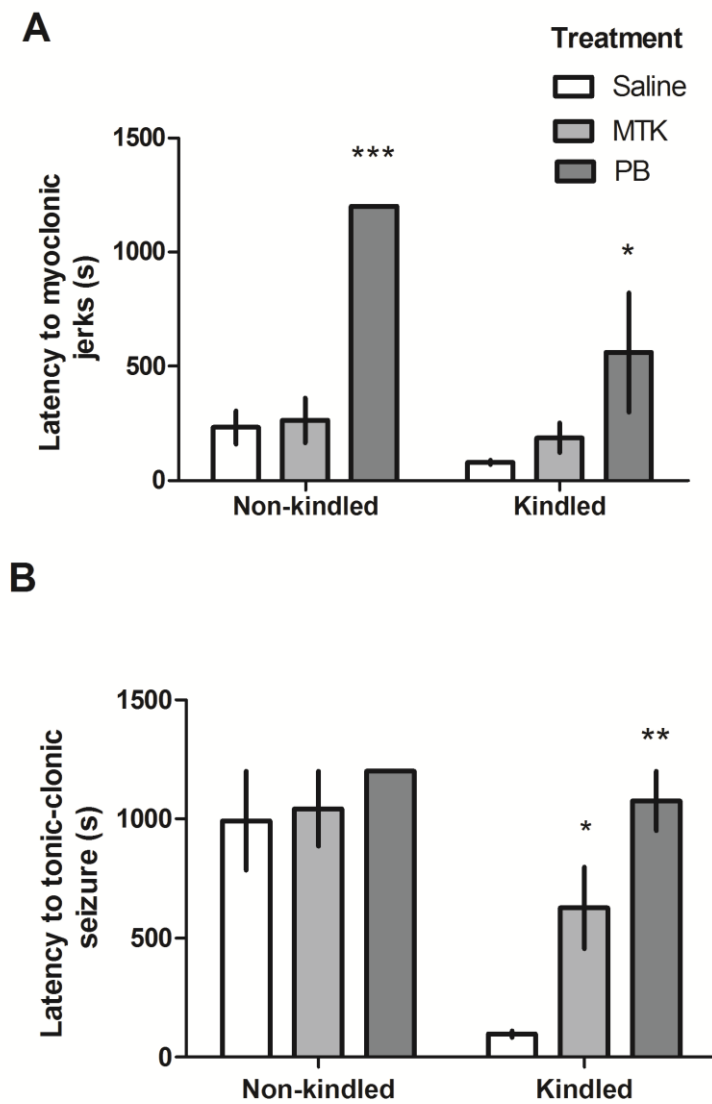


Figure 3 – Effect of montelukast (MTK) and phenobarbital (PB) on PTZ-induced seizures (35 mg/kg, i.p.). (A) Latency to myoclonic jerk (B) Latency to tonic-clonic generalized seizure. Data expressed as median and interquartile range for $n = 4-8$ in each experimental group. A probability of $p < 0.05$ was considered significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with vehicle group.

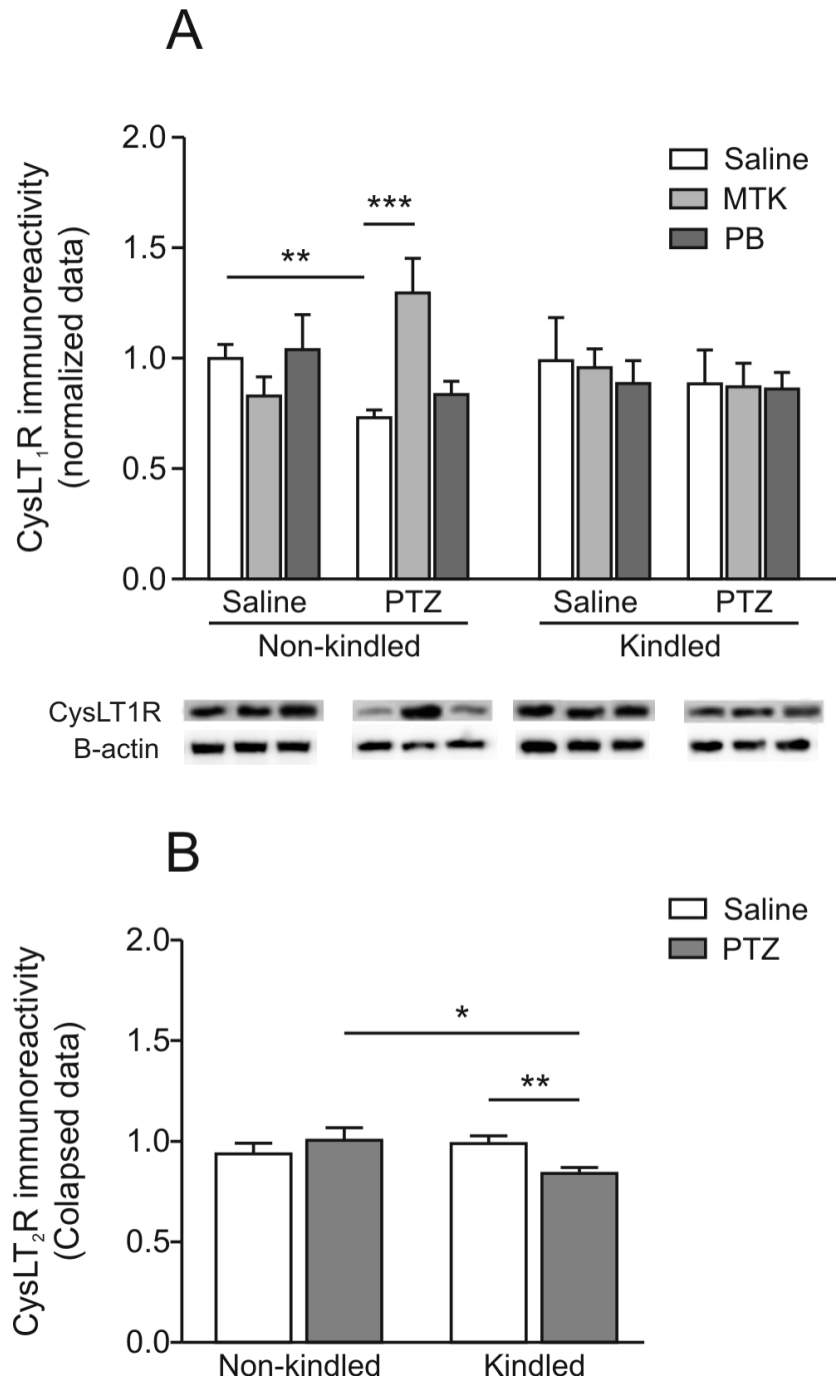


Figure 4 – Effect of PTZ kindling on CysLT₁R (A) CysLT₂R (B) immunoreactivity in the cortex. Mice were treated with saline, montelukast (MTK) or phenobarbital (PB) and challenged or not with PTZ (see materials and methods). A typical nitrocellulose membrane membrane is shown. Data are mean + SEM for n =3-5 in each group, from five different experiments. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. PTZ (pentyleneetetrazole); MTK (montelukast); PB (phenobarbital).

5 DISCUSSÃO

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada pela ocorrência, sem causa aparente, de crises convulsivas repetidas. Essas crises são desencadeadas por descargas excessivas e sincrônicas de um grupo de neurônios, resultando em alterações comportamentais e/ou motoras (ENGEL; PEDLEY, 2008; FISCHER et al., 2014). Os fármacos anticonvulsivantes constituem o tratamento de eleição para as pessoas com epilepsia. Ainda que venham ocorrendo avanços no diagnóstico e no tratamento das epilepsias, muitos pacientes não apresentam um controle satisfatório das crises. Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia e somente entre 25% e 45% estão completamente livres de crises após 12 meses de tratamento (LOSCHER; SCHMIDT, 2011). Sendo assim, torna-se necessário investir na descoberta de novas terapias anticonvulsivantes, assim como esclarecer os complexos mecanismos moleculares envolvidos na geração, recorrência e controle das crises epiléticas. Nesse sentido, neste estudo apresentamos evidências experimentais convincentes da participação de receptores para leucotrienos cisteínicos nas crises epiléticas em animais virgens experimentalmente e em animais abrasados, pela demonstração de que o montelucaste, um agonista inverso de receptores CysLT1 diminui crises epiléticas nestes animais.

Grande parte dos indivíduos que sofrem lesões cerebrais, tais como acidente vascular cerebral (AVC) e traumatismo crânio-encefálico (TCE) desenvolvem epilepsia. Nesses casos, a lesão dá origem a um foco epilético. Esse processo através do qual um indivíduo previamente assintomático passa a apresentar crises epiléticas espontâneas é denominado epileptogênese (ENGEL; PEDLEY, 2008). Existem vários modelos experimentais clássicos de epileptogênese, tais como o abrasamento elétrico e o abrasamento químico, como o modelo de PTZ. As crises prolongadas promovem um desequilíbrio metabólico acompanhado da liberação maciça de neurotransmissores excitatórios, resultando na lesão de estruturas cerebrais sensíveis. Uma vez que os sistemas de inibição não são suficientes para conter o aumento da excitabilidade neuronal, as descargas progridem e dão origem às crises epiléticas espontâneas e recorrentes (PITKANEN, 2002). De fato, animais abrasados são mais semelhantes a pacientes epiléticos, já que eles são

comparativamente mais resistentes ao efeito de fármacos antiepilépticos (WILCOX et al., 2013).

No primeiro artigo, verificamos que o montelucaste potencializa o efeito anticonvulsivante do fenobarbital em um modelo de crises convulsivas agudas em camundongos. O estudo da interação entre o fenobarbital e o montelucaste foi realizado por análise isoblográfica, que é uma medida quantitativa da relação dose-efeito de cada um dos fármacos administrados isoladamente e combinados. A análise isoblográfica é uma ferramenta utilizada para estabelecer o tipo de interação farmacológica entre agentes químicos, o que permite determinar se uma dada combinação de fármaco resulta em um efeito aditivo, sinérgico ou antagonista (TALLARIDA, 2000). Verificamos que a combinação de montelucaste e fenobarbital resultou em um efeito sinérgico do aumento da latência para as crises convulsivas tônico-clônicas comportamentais induzidas por PTZ em camundongos. Esse efeito foi ainda mais pronunciado no EEG destes animais. A amplitude e o número de descargas epileptiformes foram muito menores nos animais que receberam a combinação de montelucaste e fenobarbital do que os que receberam cada fármaco individualmente, em doses previamente estabelecidas como equieficazes (DE_{50}) em experimento comportamental. Para evitar possíveis interações farmacocinéticas, administramos os fármacos por diferentes vias (i.c.v. e oral). Portanto, o sinergismo observado não pode ser atribuído a uma competição pelas proteínas plasmáticas, diminuição do metabolismo hepático ou o aumento do transporte do fenobarbital na BHE, uma vez que o montelucaste foi administrado diretamente no cérebro (i.c.v.). As proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRP) são responsáveis pelo efluxo de várias substâncias através da membrana para o espaço extracelular, incluindo os leucotrienos LTB_4 e LTC_4 (JEDLITSCHKY et al., 1994; DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006). A superexpressão dessas proteínas diminui a passagem de drogas antiepilépticas pela BHE (SCHMIDT; LOSCHER, 2005). Foi mostrado que o montelucaste inibe as proteínas transportadoras MRP1 (MUELLER et al., 2008) MRP2 (ROY et al., 2009) e MRP4 (RIUS; HUMMEL-EISENBEISS; KEPPLER, 2008). Entretanto, é pouco provável que esses transportadores estejam envolvidos na potencialização do efeito anticonvulsivante do fenobarbital pelo montelucaste, uma vez que esse efeito foi revertido por LTD_4 , um agonista do receptor de $CysLT_1$. Além disso, o fenobarbital não é um substrato preferencial para esses transportadores, mas sim para a glicoproteína P (MDR1), outra proteína de resistência a múltiplas

drogas (POTSCHKA; FEDROWITZ; LOSCHER, 2003). Por fim, a associação de montelucaste e fenobarbital diminuiu a sedação, um dos principais efeitos adversos do fenobarbital, o que sugere que o efeito do montelucaste não se deu por um aumento da concentração do fenobarbital no SNC, pois foi necessária uma quantidade menor de barbitúricos para atingir o mesmo efeito anticonvulsivante (DE_{50}). Dessa forma, houve uma melhora do efeito desejável (anticonvulsivante) e uma diminuição dos efeitos adversos (sedação), uma combinação benéfica para os pacientes.

Vários estudos têm proposto o envolvimento dos leucotrienos cisteínicos em diversas doenças do SNC, incluindo a epilepsia. De fato, Palmer e colaboradores (1981) mostraram que o LTD_4 aumenta a excitabilidade em células de Purkinje (PALMER et al., 1981), sugerindo um papel excitatório para este mediador inflamatório. Lenz e colaboradores (2014) também mostraram que o LTD_4 aumenta a infiltração leucocitária no encéfalo. Além disso, o montelucaste foi capaz de reduzir o número de células positivas para CD45/IgG, evidenciando um efeito protetor do montelucaste sobre a permeabilidade da BHE (LENZ et al., 2014). Evidências clínicas e experimentais também sugerem que um aumento na permeabilidade da BHE facilita o estabelecimento de foco epileptogênico (OBY; JANIGRO, 2006; FRIEDMAN; HEINEMANN, 2012; HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012). Alterações inflamatórias na vasculatura do SNC podem intensificar a adesão de leucócitos circulantes, amplificar o dano vascular e, conseqüentemente, ativar mecanismos relacionados à glia e aos neurônios, determinando a epileptogênese. A falência funcional das junções de oclusão endoteliais aumenta a permeabilidade da BHE e a expressão de moléculas de adesão de leucócitos no endotélio, permitindo o extravasamento de componentes plasmáticos no SNC, como a albumina e o K^+ . A albumina ativa o receptor do fator transformante de crescimento beta ($TGF\beta R2$), cuja sinalização é responsável pela ativação de astrócitos. A expressão de transportadores de glutamato (GLT-1), canais de potássio (Kir4.1) e canais de água, como a aquaporina 4 (AQP4) estão diminuídos nos astrócitos ativados (HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012). Esses dados sugerem uma ligação patogênica entre o dano na BHE e a gênese das crises convulsivas.

Estudos recentes mostram que a administração sistêmica aguda de pranlucaste (TAKAHASHI et al., 2013) e montelucaste (REHNI; SINGH, 2011) não diminui crises convulsivas em camundongos, mas a medida que o animal vai ficando

abrasado, o montelucaste suprimiu o desenvolvimento das crises. Lenz (2014) também verificou que o montelucaste administrado por via sistêmica não diminui as crises em modelo animal agudo de PTZ, mas quando administrado por via i.c.v., esse efeito era observado (LENZ et al., 2014). Isso nos levou a questionar se o efeito protetor do montelucaste era por que a inserção da cânula para a administração da droga induz rompimento da BHE e um processo inflamatório local* com aumento da expressão de receptores leucotriênicos ou apenas facilita a entrada da droga no SNC. Dessa forma, baseado nos dados da literatura que suportam o papel dos leucotrienos cisteínicos na fisiopatologia das crises convulsivas, bem como os achados descritos no primeiro artigo, decidimos investigar se o efeito anticonvulsivante do montelucaste, depende do prévio rompimento da BHE ou do aumento na expressão dos receptores CysLT₁.

No manuscrito mostramos que o montelucaste e o fenobarbital sistêmicos diminuíram a latência para as crises convulsivas tônico-clônicas em camundongos abrasados. A ruptura da BHE é uma das várias alterações metabólicas e morfofuncionais que decorrem do abrasamento (LAMAS; GONZALEZ-MARISCAL; GUTIERREZ, 2002). Da mesma forma, é bem conhecido que o montelucaste é pouco permeável à BHE intacta (TAKAHASHI et al., 2013).

Outra explicação plausível para o efeito do montelucaste ocorrer somente em animais abrasados seria a expressão diferenciada de receptores para leucotrienos nestes animais. Entretanto, verificamos que o montelucaste não alterou a expressão dos receptores CysLTs nos animais previamente sensibilizados com PTZ (abrasados). Da mesma forma, o abrasamento induzido por PTZ também não altera a expressão dos receptores benzodiazepínicos e NMDA em ratos (ATAK et al., 2000). Já é bem estabelecido que receptores acoplados a proteína G (GPCRs), assim como os receptores CysLTs, sofrem internalização após um estímulo prolongado (GAINETDINOV et al., 2004). Entretanto, em nossas condições experimentais, não é possível avaliar a translocação desses receptores na membrana celular ou nuclear, assim como a expressão diferencial nas células do SNC. Desta forma, parece que o efeito anticonvulsivante do montelucaste não ocorreu pelo aumento na expressão dos receptores CysLT₁, mas sim do prévio rompimento da BHE induzido pela inserção da cânula na estrutura cerebral ou pelo abrasamento induzido por PTZ. Sendo assim, é esperado que o montelucaste tenha efeito em pacientes epiléticos, por apresentarem disfunção na BHE.

Ainda que não tenhamos verificado os mecanismos celulares pelos quais o montelucaste protege os animais das crises induzidas por PTZ, é possível que o mesmo tenha se dado pela diminuição da excitabilidade neuronal. De fato, o montelucaste previne a diminuição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida por LTD_4 em fatias de hipocampo de camundongos (LENZ et al., 2014). Esta enzima é vital para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e ação, assim como a recaptação e liberação de neurotransmissores (SKOU; ESMANN, 1992; MOSELEY et al., 2007) e a sua inibição parcial facilita crises (VAILLEND et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

A aprovação clínica de um novo fármaco é um esforço longo e árduo, além de extremamente caro. É necessário identificar o alvo *in vitro*, realizar todos os processos de validação da sua eficácia em estudos pré-clínicos *in vivo*, e os testes de segurança e eficácia em ensaios clínicos humanos. Portanto, é interessante que drogas já em uso na clínica e com baixo potencial de toxicidade possam ser utilizadas para outras indicações terapêuticas.

Desta forma, os antagonistas de receptores CysLT_1 , indicados no tratamento da asma humana, parecem surgir como agentes terapêuticos adjuntos promissores no tratamento de crises epiléticas refratárias. Neste interim é de especial interesse a patente de uso do pranlucaste como agente anticonvulsivante adjunto (ANAXOMICS BIOTECH, 2014) e o estudo recente de Takahashi e colaboradores (2013), que mostraram que o pranlucaste potencializa a ação anticonvulsivante não só do fenobarbital, mas também da carbamazepina, zonisamida, valproato e fenitoína (TAKAHASHI et al., 2013). Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar as implicações clínicas deste trabalho no que diz respeito ao uso específico do montelucaste como agente anticonvulsivante adjunto na clínica.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões do Artigo

- O montelucaste potencializa o efeito anticonvulsivante do fenobarbital nas crises convulsivas induzidas pelo PTZ em camundongos;
- O montelucaste interage com o fenobarbital, sinergicamente diminuindo as crises convulsivas induzidas pelo PTZ em camundongos;
- A dose anticonvulsivante do fenobarbital, na presença de montelucaste, não tem efeito sedativo.

6.2 Conclusões do Manuscrito

- O montelucaste diminui as crises convulsivas induzidas por PTZ em camundongos abrasados;
- O fenobarbital diminui as crises convulsivas induzidas por PTZ em camundongos abrasados;
- O desafio com PTZ reduz a imunorreatividade do receptor CysLT₁ em córtex de camundongos que não foram submetidos ao abrasamento;
- O montelucaste aumenta a imunorreatividade do receptor CysLT₁ em córtex de camundongos desafiados com PTZ que não foram submetidos ao abrasamento;
- O abrasamento abole todos os efeitos sobre a imunorreatividade do receptor CysLT₁ em córtex de camundongos;
- O desafio com PTZ diminui a imunorreatividade do receptor CysLT₂ em córtex de camundongos abrasados.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento sugerem que o efeito anticonvulsivante do montelucaste pode ser mediado, pelo menos em parte, por bloqueio do receptor CysLT₁, já que a administração de LTD₄ reverteu este efeito. Nesse sentido, uma das perspectivas para a continuação desse trabalho é de verificar os eventos que ocorrem após a ativação dos receptores CysLT, a fim de elucidar os mecanismos moleculares pós-receptor envolvidos no efeito anticonvulsivante do montelucaste.

Sabe-se que os receptores CysLTs são acoplados à proteína G_q, e, após ativação, estimulam a fosfolipase C e a formação de DAG e IP₃. Por sua vez, o DAG ativa a PKC e o IP₃ promove a abertura de canais de Ca⁺² presentes na membrana do retículo endoplasmático, aumentando a concentração intracelular de Ca⁺². A PKC é ativada pelo Ca⁺² após a retirada do bloqueio do sítio catalítico que ocorre subsequente à ligação com o DAG (SINGH et al., 2010; WANG et al., 2012). A liberação de glutamato sináptico é dependente de Ca⁺² e o excesso de glutamato liberado na fenda sináptica pode promover uma maior excitabilidade neuronal, levando ao desenvolvimento de convulsões (CICCARELLI et al., 2004; HALASSA; HAYDON, 2010). Dessa forma, nossa proposta futura de continuidade é dosar a concentração de Ca⁺² intracelular e avaliar a imunorreatividade da PKC em sinaptossoma e fatias de córtex na presença de PTZ, do agonista (LTD₄) e do agonista inverso (montelucaste) dos receptores CysLT₁.

Verificamos, ainda, que o montelucaste administrado por via sistêmica não diminui as crises em modelo animal agudo de PTZ. Somente quando o fármaco era administrado por via i.c.v. ou quando o animal estava abrasado, o efeito anticonvulsivante era observado. Esse efeito protetor do montelucaste depende, provavelmente, da prévia permeabilização da BHE. Portanto, seria relevante dosar o montelucaste no tecido cerebral e no plasma dos animais abrasados para verificar quanto do fármaco está atravessando a BHE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIRAD, N. et al. Effect of minocycline on pentylentetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. **Neurol Sci**, v. 35, n. 4, p. 571-576, 2014.

ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 734-744, 2001.

ANAXOMICS BIOTECH SI. Mireia Coma et al. **New combination therapies for treating nervous system diseases**. WO 2014111525 A2, 24 jul 2014.

ATAACK, J. R. et al. Kindling induced by pentylentetrazole in rats is not directly associated with changes in the expression of NMDA or benzodiazepine receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 743-750, 2000.

BACK, M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. **Life Sci**, v. 71, n. 6, p. 611-622, 2002.

BACK, M. et al. Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 15, p. 3551-3574, 2014.

BALABANOV, R.; BEAUMONT, T.; DORE-DUFFY, P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. **J Neurosci Res**, v. 55, n. 5, p. 578-587, 1999.

BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D.; ALLEN HAUSER, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. **Epilepsy Res**, v. 85, n. 1, p. 31-45, 2009.

BASKAYA, M. K. et al. Protective effect of the 5-lipoxygenase inhibitor AA-861 on cerebral edema after transient ischemia. **J Neurosurg**, v. 85, n. 1, p. 112-116, 1996.

BAZAN, N. G. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. **J Lipid Res**, v. 44, n. 12, p. 2221-2233, 2003.

BEDNER, P.; STEINHAUSER, C. Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. **Neurochem Int**, v. 63, n. 7, p. 682-687, 2013.

BORDEY, A.; SONTHEIMER, H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. **Epilepsy Res**, v. 32, n. 1-2, p. 286-303, 1998.

BOROWICZ, K. K. et al. Effect of gabapentin on the anticonvulsant activity of antiepileptic drugs against electroconvulsions in mice: an isobolographic analysis. **Epilepsia**, v. 43, n. 9, p. 956-963, 2002.

BRODIE, M. J.; KWAN, P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 8, p. 40-46, 2012.

BUSH, A. Montelukast in paediatric asthma: where we are now and what still needs to be done? **Paediatr Respir Rev**, v. 16, n. 2, p. 97-100, 2015.

CAPRA, V. et al. CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 23, p. 5625-5636, 2005.

CARRAZANA, E. et al. Epilepsy and religious experiences: Voodoo possession. **Epilepsia**, v. 40, n. 2, p. 239-241, 1999.

CAVAZOS, J. E.; JONES, S. M.; CROSS, D. J. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. **Neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 677-688, 2004.

CHEBOLU, S. et al. Pranlukast prevents cysteinyl leukotriene-induced emesis in the least shrew (*Cryptotis parva*). **Eur J Pharmacol**, v. 628, n. 1-3, p. 195-201, 2010.

CHOI, J. et al. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **J Neuroinflammation**, v. 6, p. 38, 2009.

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

CICCARELLI, R. et al. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 6, p. 1514-1524, 2004.

CORSER-JENSEN, C. E. et al. Blocking leukotriene synthesis attenuates the pathophysiology of traumatic brain injury and associated cognitive deficits. **Exp Neurol**, v. 256, p. 7-16, 2014.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 490-499, 2009.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 849-899, 2006.

DENZLINGER, C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 23, n. 3, p. 167-223, 1996.

DEVINSKY, O. et al. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 3, p. 174-184, 2013.

DEVINSKY, O.; LAI, G. Spirituality and religion in epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 4, p. 636-643, 2008.

DHILLON, H. S.; DOSE, J. M.; PRASAD, M. R. Regional generation of leukotriene C4 after experimental brain injury in anesthetized rats. **J Neurotrauma**, v. 13, n. 12, p. 781-789, 1996.

DUPRE, D. J. et al. Inverse agonist activity of selected ligands of the cysteinyl-leukotriene receptor 1. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 1, p. 102-108, 2004.

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

ERAKOVIC, V. et al. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol--induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.

FABENE, P. F.; BRAMANTI, P.; CONSTANTIN, G. The emerging role for chemokines in epilepsy. **J Neuroimmunol**, v. 224, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

FABENE, P. F. et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1377-1383, 2008.

FARIAS, S. et al. Injury-related production of cysteinyl leukotrienes contributes to brain damage following experimental traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 11, p. 1977-1986, 2009.

FARIAS, S. E. et al. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in rat neuronal and glial cells. **J Neurochem**, v. 103, n. 4, p. 1310-1318, 2007.

FERRARO, T. N. et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. **J Neurosci**, v. 19, n. 16, p. 6733-6739, 1999.

FFRENCH-MULLEN, J. M.; BARKER, J. L.; ROGAWSKI, M. A. Calcium current block by (-)-pentobarbital, phenobarbital, and CHEB but not (+)-pentobarbital in acutely isolated hippocampal CA1 neurons: comparison with effects on GABA-activated Cl⁻ current. **J Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 3211-3221, 1993.

FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 14, n. 3, p. 245-278, 1989.

FISHER, R. S. Final comments on the process: ILAE definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 492-493, 2014.

FLECK, J. et al. Montelukast potentiates the anticonvulsant effect of phenobarbital in mice: an isobolographic analysis. **Pharmacol Res**, v. 94, p. 34-41, 2015.

FOLCO, G.; MURPHY, R. C. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 375-388, 2006.

FRANKE, H.; KITNER, H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p. 291-303, 2001.

FRIEDMAN, A.; HEINEMANN, U. Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. 2012.

GAINETDINOV, R. R. et al. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 107-144, 2004.

GATTAZ, W. F. et al. Increased PLA2 activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. **J Psychiatr Res**, v. 45, n. 12, p. 1617-1620, 2011.

GETOVA, D.; FROESTL, W.; BOWERY, N. G. Effects of GABAB receptor antagonism on the development of pentylenetetrazol-induced kindling in mice. **Brain Res**, v. 809, n. 2, p. 182-188, 1998.

GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 615-649, 1987.

GOLARAI, G.; CAVAZOS, J. E.; SUTULA, T. P. Activation of the dentate gyrus by pentylentetrazol evoked seizures induces mossy fiber synaptic reorganization. **Brain Res**, v. 593, n. 2, p. 257-264, 1992.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GORZ, A. M.; SILVADO, C. E.; BITTENCOURT, P. R. Barbiturate-refractory epilepsy: safe schedule for therapeutic substitution. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 44, n. 3, p. 225-231, 1986.

GURSES, C. et al. Levetiracetam decreases the seizure activity and blood-brain barrier permeability in pentylentetrazole-kindled rats with cortical dysplasia. **Brain Res**, v. 1281, p. 71-83, 2009.

GUSTIN, A. et al. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130624, 2015.

HALASSA, M. M.; HAYDON, P. G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 335-355, 2010.

HAUACHE, O. M. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 5, p. 577-584, 2001.

HEDI, H.; NORBERT, G. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. **J Biomed Biotechnol**, v. 2004, n. 2, p. 99-105, 2004.

HEINEMANN, U.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. **Glia**, v. 60, n. 8, p. 1251-1257, 2012.

HICKEY, W. F.; KIMURA, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. **Science**, v. 239, n. 4837, p. 290-292, 1988.

HORRILLO, R. et al. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. **J Immunol**, v. 184, n. 7, p. 3978-3987, 2010.

HUANG, L. T. et al. Pentylentetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. **Epilepsia**, v. 43, n. 6, p. 567-573, 2002.

IRANI, D. N.; LIN, K. I.; GRIFFIN, D. E. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. **J Immunol**, v. 157, n. 10, p. 4333-4340, 1996.

JATANA, M. et al. Inhibition of NF-kappaB activation by 5-lipoxygenase inhibitors protects brain against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. **J Neuroinflammation**, v. 3, p. 12, 2006.

JEDLITSCHKY, G. et al. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. **Cancer Res**, v. 54, n. 18, p. 4833-4836, 1994.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 429-439, 2002.

KALE, R. Bringing epilepsy out of the shadows. **BMJ**, v. 315, n. 7099, p. 2-3, 1997.

KIM, C. J. et al. Eosinophils recruited to the lung by segmental antigen challenge show a reduced chemotactic response to leukotriene B4. **Prostaglandins**, v. 47, n. 5, p. 393-403, 1994.

KIM, D. Y.; JEOUNG, D.; RO, J. Y. Signaling pathways in the activation of mast cells cocultured with astrocytes and colocalization of both cells in experimental allergic encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 273-283, 2010.

KIM, H. C. et al. Phenydone prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. **Brain Res**, v. 874, n. 1, p. 15-23, 2000.

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

KLEEN, J. K.; HOLMES, G. L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1309-1310, 2008.

KLITGAARD, H.; MATAGNE, A.; LAMBERTY, Y. Use of epileptic animals for adverse effect testing. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 55-65, 2002.

KUPFERBERG, H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 4, p. 7-12, 2001.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review. **Epilepsia**, v. 45, n. 9, p. 1141-1149, 2004.

LAMAS, M.; GONZALEZ-MARISCAL, L.; GUTIERREZ, R. Presence of claudins mRNA in the brain. Selective modulation of expression by kindling epilepsy. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 104, n. 2, p. 250-254, 2002.

LENZ, Q. F. et al. Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. **Neuroscience**, v. 277, p. 859-871, 2014.

LI, J. et al. Inverse agonist up-regulates the constitutively active D3.49(164)Q mutant of the rat mu-opioid receptor by stabilizing the structure and blocking constitutive internalization and down-regulation. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 5, p. 1064-1075, 2001.

LI, S. C. et al. Epidemiology of epilepsy in urban areas of the People's Republic of China. **Epilepsia**, v. 26, n. 5, p. 391-394, 1985.

LOPEZ-MUNOZ, F.; UCHA-UDABE, R.; ALAMO, C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 1, n. 4, p. 329-343, 2005.

LOSCHER, W. Animal models of drug-resistant epilepsy. **Novartis Found Symp**, v. 243, p. 149-159; discussion 159-166, 180-145, 2002.

LOSCHER, W.; ROGAWSKI, M. A. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 8, p. 12-25, 2012.

LOSCHER, W.; SIEMES, H. Increased concentration of prostaglandin E-2 in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. **Epilepsia**, v. 29, n. 3, p. 307-310, 1988.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657-678, 2011.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation? **Epilepsy Res**, v. 17, n. 2, p. 95-134, 1994.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res**, v. 2, n. 3, p. 145-181, 1988.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337-341, 2015.

LUSZCZKI, J. J. et al. Interactions between oxcarbazepine and conventional antiepileptic drugs in the maximal electroshock test in mice: an isobolographic analysis. **Epilepsia**, v. 44, n. 4, p. 489-499, 2003.

MACLOUF, J. A.; MURPHY, R. C. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C4. **J Biol Chem**, v. 263, n. 1, p. 174-181, 1988.

MACNAMARA, K. C.; WEISS, S. R. CD8+ T-cell priming during a central nervous system infection with mouse hepatitis virus. **Adv Exp Med Biol**, v. 581, p. 385-390, 2006.

MANDAL, A. K. et al. The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 51, p. 20434-20439, 2008.

MANEV, H. 5-Lipoxygenase gene polymorphism and onset of Alzheimer's disease. **Med Hypotheses**, v. 54, n. 1, p. 75-76, 2000.

MANEV, H.; UZ, T.; QU, T. Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase following systemic administration of kainate to rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 12, n. 2-3, p. 81-85, 1998.

MARCHETTI, R. L. et al. Psychiatric diagnoses of patients with psychogenic non-epileptic seizures. **Seizure**, v. 17, n. 3, p. 247-253, 2008.

MAROSO, M. et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nat Med**, v. 16, n. 4, p. 413-419, 2010.

MATSUO, M. et al. Leukotriene B4 and C4 in cerebrospinal fluid from children with meningitis and febrile seizures. **Pediatr Neurol**, v. 14, n. 2, p. 121-124, 1996.

MATYSZAK, M. K. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 1, p. 19-35, 1998.

MELDRUM, B. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 33-40, 2002.

MISRA, U. K.; TAN, C. T.; KALITA, J. Viral encephalitis and epilepsy. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 6, p. 13-18, 2008.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

MUELLER, C. F. et al. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. **Circulation**, v. 117, n. 22, p. 2912-2918, 2008.

NARDOU, R. et al. Phenobarbital but Not Diazepam Reduces AMPA/kainate Receptor Mediated Currents and Exerts Opposite Actions on Initial Seizures in the Neonatal Rat Hippocampus. **Front Cell Neurosci**, v. 5, p. 16, 2011.

NEUMANN, H. The immunological microenvironment in the CNS: implications on neuronal cell death and survival. **J Neural Transm Suppl**, v. 59, p. 59-68, 2000.

NIES, A. S.; SPIELBERG, S. P., Eds. **Princípios da Terapêutica. In: Hardman JG & Limbird LE. Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. .** Rio de Janeiro: McGraw-Hill 9. ed ed. 1996

NITSCH, C.; KLATZO, I. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. **J Neurol Sci**, v. 59, n. 3, p. 305-322, 1983.

OBY, E.; JANIGRO, D. The blood-brain barrier and epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 11, p. 1761-1774, 2006.

OLIVEIRA, M. S. et al. Modulation of pentylene-tetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1110-1118, 2008.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v. 109, n. 2, p. 416-426, 2009.

ORGANIZATION, W. H. Epilepsy: Fact sheets. v. 999, 2015.

PALMER, M. R. et al. Electrophysiological response of cerebellar Purkinje neurons to leukotriene D4 and B4. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 219, n. 1, p. 91-96, 1981.

PAVLOVA, T. V. et al. Pentylentetrazol kindling in rats: Is neurodegeneration associated with manifestations of convulsive activity? **Neurosci Behav Physiol**, v. 36, n. 7, p. 741-748, 2006.

PERUCCA, E.; FRENCH, J.; BIALER, M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 9, p. 793-804, 2007.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Res Rev**, v. 52, n. 2, p. 201-243, 2006.

PITKANEN, A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. **Neurology**, v. 59, n. 9 Suppl 5, p. S27-33, 2002.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S., Eds. **Models of Seizures and Epilepsy**: Elseviered. 2006.

POTSCHKA, H.; FEDROWITZ, M.; LOSCHER, W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 1, p. 124-131, 2003.

REHNI, A. K.; SINGH, T. G. Modulation of leukotriene D4 attenuates the development of seizures in mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, n. 2, p. 97-106, 2011.

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

RIUS, M.; HUMMEL-EISENBEISS, J.; KEPPLER, D. ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP4). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 324, n. 1, p. 86-94, 2008.

ROY, U. et al. Montelukast is a potent and durable inhibitor of multidrug resistance protein 2-mediated efflux of taxol and saquinavir. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 12, p. 2002-2009, 2009.

SAAD, M. A. et al. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist protects against hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in rats. **Neurochem Res**, v. 40, n. 1, p. 139-150, 2015.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.

SCHMIDT, D.; LOSCHER, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. **Epilepsia**, v. 46, n. 6, p. 858-877, 2005.

SCHUHMANN, M. U. et al. Temporal profiles of cerebrospinal fluid leukotrienes, brain edema and inflammatory response following experimental brain injury. **Neurol Res**, v. 25, n. 5, p. 481-491, 2003.

SHENOY, S. K.; LEFKOWITZ, R. J. beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 9, p. 521-533, 2011.

SHIMADA, T. et al. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 901902, 2014.

SIMMET, T.; TIPPLER, B. Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. **Brain Res**, v. 515, n. 1-2, p. 79-86, 1990.

SIMMET, T.; PESKAR, B. A. Lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acid metabolism in the central nervous system: biosynthesis and putative functions. **Pharmacol Res**, v. 22, n. 6, p. 667-682, 1990.

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

SINGH, R. K. et al. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. **Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 336-349, 2010.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr**, v. 24, n. 3, p. 249-261, 1992.

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

STARK, D. T.; BAZAN, N. G. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors differentially modulate neuronal cyclooxygenase-2 function, lipid peroxidation, and neuroprotection. **J Neurosci**, v. 31, n. 39, p. 13710-13721, 2011.

TAKAHASHI, Y. et al. Open study of pranlukast add-on therapy in intractable partial epilepsy. **Brain Dev**, v. 35, n. 3, p. 236-244, 2013.

TALLARIDA, R. J., Ed. **Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis**: Chapman & Hall/CRCed. 2000.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 342, n. 1, p. 2-8, 2012.

TANG, S. S. et al. Leukotriene D4 induces cognitive impairment through enhancement of CysLT(1) R-mediated amyloid-beta generation in mice. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 182-192, 2013.

TOMKINS, O. et al. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. **Neurobiol Dis**, v. 25, n. 2, p. 367-377, 2007.

TU, X. K. et al. Zileuton reduces inflammatory reaction and brain damage following permanent cerebral ischemia in rats. **Inflammation**, v. 33, n. 5, p. 344-352, 2010.

VAILLEND, C. et al. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. **J Neurophysiol**, v. 88, n. 6, p. 2963-2978, 2002.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. **Semin Cell Dev Biol**, v. 38, p. 26-34, 2015.

VAN VLIET, E. A. et al. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 130, n. Pt 2, p. 521-534, 2007.

VERROTTI, A. et al. Epilepsy and suicide: pathogenesis, risk factors, and prevention. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 2, p. 365-370, 2008.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomark Med**, v. 5, n. 5, p. 607-614, 2011.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-1743, 2005.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 8, p. 626-640, 2005.

WALKER, L.; SILLS, G. J. Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? **Epilepsy Curr**, v. 12, n. 1, p. 8-12, 2012.

WANG, X. et al. Regulation of PKC-theta function by phosphorylation in T cell receptor signaling. **Front Immunol**, v. 3, p. 197, 2012.

WILCOX, K. S. et al. Issues related to development of new antiseizure treatments. **Epilepsia**, v. 54 Suppl 4, p. 24-34, 2013.

XANTHOS, D. N.; SANDKUHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 43-53, 2014.

YASIRY, Z.; SHORVON, S. D. How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: the story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 8, p. 26-39, 2012.

YEGIN, A. et al. Secretory phospholipase A2 and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. **Acta Neurol Scand**, v. 106, n. 5, p. 258-262, 2002.

ZHAO, L.; AU, J. L.; WIENTJES, M. G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 2, p. 241-249, 2010.

ZHOU, Y. et al. Spatio-temporal properties of 5-lipoxygenase expression and activation in the brain after focal cerebral ischemia in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 17, p. 1645-1656, 2006.