

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Estágio em Pesquisa e Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES NMDA
EXTRASINÁPTICOS SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE *STATUS*
EPILEPTICUS INDUZIDO POR LICL-PILOCARPINA**

MARIANA GÜNTHER BORGES

Porto Alegre
Dezembro/2013

MARIANA GÜNTHER BORGES

**EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES NMDA
EXTRASINÁPTICOS SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE *STATUS
EPILEPTICUS* INDUZIDO POR LICL-PILOCARPINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre
Dezembro/2013

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos colegas do laboratório 24 pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.

Ao meu orientador, Diogo Losch de Oliveira, agradeço por todo apoio e por todos os ensinamentos, por me receber no laboratório para a realização do trabalho de conclusão de curso e por acreditar no meu potencial.

Ao Cássio, que me acompanhou e me guiou durante esse projeto e que sempre esteve disposto a ajudar e ensinar da melhor maneira possível.

A Clarissa, Lauryn, Mariana, Michelle, Luciana, Maira e Thais pela especial e essencial amizade formada durante a faculdade.

Aos colegas de faculdade, pelos momentos de alegria e companheirismo durante a faculdade.

Às amigas Gabriela, Isabel, Laura, Luiza, Mariana e Vanessa pelo apoio, companheirismo diversão e amizade.

Aos meus amigos de intercâmbio Luciana, Tiara, João Cleber, João Francisco, Ciro, Mark, Luisa, Cynthia e Augusto por terem sido fundamentais no meu intercâmbio e pelos momentos inesquecíveis.

À minha família, pelo apoio, incentivo, momentos de alegria e por acreditar sempre em mim.

RESUMO

Epilepsias são transtornos neurológicos caracterizados por crises epiléticas recorrentes que resultam da atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica. O *status epilepticus* (SE) é caracterizado por uma crise epilética com duração maior que 30 minutos ou crises sucessivas nas quais os níveis de consciência do paciente não são recuperados entre elas. Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia, sendo mais frequente em crianças e idosos. O SE, quando ocorrido durante a infância, pode induzir morte neuronal e levar a alterações comportamentais e cognitivas na idade adulta, sendo que a neurodegeneração pode estar envolvida na gênese dessas alterações.

Nesse estudo buscou-se compreender o papel de antagonistas de receptores NMDA extrasinápticos na morte neuronal em animais jovens submetidos ao modelo de SE induzido por LiCl-pilocarpina. Ratos Wistar de 16 dias de vida receberam uma injeção de pilocarpina (60mg/kg i.p.) 12-18h após terem recebido LiCl (3mEq/kg i.p.). Os animais receberam, 15 minutos após a injeção de pilocarpina, injeções de cetamina, antagonista não seletivo de receptores NMDA, ou injeções de antagonistas de receptores NMDA extrasinápticos, CP-101 606 ou CI-1041, para investigação do efeito dessas drogas sobre a morte neuronal induzida pelo SE. Observou-se nesse estudo que o SE induz perda neuronal na região CA1 do hipocampo, amígdala e regiões VM (núcleo ventromedial) e VPM (ventroposteromedial) do tálamo, 7 dias após a convulsão. A administração de cetamina foi capaz de atenuar as crises convulsivas e de prevenir a neurodegeneração. Ao contrário da cetamina, a injeção de antagonistas específicos da subunidade GluN2B de receptores NMDA (CP-101 606 ou CI-1041) não foi capaz de interromper a convulsão. Foi observada, no entanto, prevenção da morte neuronal com a administração de CI-101 606 na amígdala, no hipocampo e no tálamo. Já a droga CP-101 606 não foi capaz de prevenir a neurodegeneração, o que pode indicar uma diferença farmacológica e/ou cinética na ação desses dois antagonistas de NMDAR.

ABSTRACT

Epilepsy is a group of neurologic disorders characterized by recurrent seizures that results from excessive, abnormal and hypersynchronous neuronal activity. *Status epilepticus* (SE) is an epileptic seizure of 30 minutes or successive seizures in which the levels of the patient's awareness are not recovered between them. There are around 50 million people in the world that are epileptic and the children and elderly's population are the most affected. When SE occurs during childhood can lead to neuronal death and to behavioral and cognition problems in adulthood. Neuronal death can be considered the cause for these alterations observed in epileptic patients.

One this study we aimed to investigate the effect of extra-synaptic NMDA receptors antagonists on neuronal death in young rats submitted to SE induced by LiCl-pilocarpine. Young Wistar rats (16 days old) received pilocarpine injection (60mg/kg i.p.) 12-18h after LiCl (3mEq/kg i.p.) injection. Fifteen minutes after pilocarpine injection, animals received ketamine, a non-selective NMDAR antagonist, or extrasynaptic NMDAR antagonists, CP-101 606 or CI-1041, to investigate the effect of these drugs on neuronal death induced by SE. It was observed, on this study, that SE induced on young rats leads to an expressive neuronal loss on CA1 hippocampal subfield, MePV amygdala subfield and VM (ventral medial nucleus) and VPM (ventral posteromedial nucleus) thalamus subfield, 7 days after SE. Ketamine administration was able to moderate the epileptic seizures and to prevent neuronal death. In contrast with ketamine treatment, specific GluN2B NMDAR subunit antagonists (CP-101 606 or CI-1041) couldn't stop the epileptic seizure. However, neuronal death on amygdala, hippocampus and thalamus was prevented with CI-1041 administration. CP-101 606, on the other hand, wasn't able to prevent neuronal death, what can indicate a pharmacological and/or kinetic difference of both NMDAR antagonists.

ABREVIATURAS

AMPA	2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
EAAT1 (GLAST)	Transportador de aminoácido 1
EAAT2 (GLT-1)	Transportador de aminoácido 2
FJC	Fluoro-Jade C
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
i.p.	intraperitoneal
MePV	Medial postero ventral
NeuN	Neuronal nuclei
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NMDAR	Receptor NMDA
PAG	Phosphate-dependent glutaminase
PBS	Tampão salina fosfato
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central
VM	Ventromedial
VPM	Ventroposteromedial

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. EPILEPSIA.....	10
1.2. <i>STATUS EPILEPTICUS</i>	11
1.3. GLUTAMATO	12
1.4. CICLO GLUTAMATO-GLUTAMINA	12
1.5. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	14
1.6. RECEPTORES NMDA	14
1.7. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA	16
1.8. RECEPTORES NMDA EXTRASSINÁPTICOS	16
1.9. NEUROPROTEÇÃO COM ANTAGONISTAS DE NMDAR.....	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
ARTIGO CIENTÍFICO	
1. INTRODUCTION	20
2. MATERIAL AND METHODS	22
2.1. Research location	22
2.2. Subjects	22
2.3. Induction of <i>status epilepticus</i>	22
2.4. Histological analysis.....	23
2.5. Fluoro-Jade C staining	23
2.6. Immunofluorescence.....	24
2.7. Statistical analysis	24
2.8. Ethical considerations (for animal research).....	24
3. RESULTS	25

3.1.	Convulsive pattern of status epilepticus.....	25
3.2.	Effect of SE induction on mortality.....	25
3.3.	Body weight reduction after SE induction.....	25
3.4.	Effect of CP-101 606 and CI-1041 treatment on SE-induced neuronal degeneration....	26
3.5.	Effect of CP-101 606 and CI-1041 treatment on astrocytes and microglia activity.....	26
4.	DISCUSSION	27
5.	CONCLUSIONS.....	28
6.	REFERENCES.....	28
3.	CONCLUSÃO.....	51
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIA

A epilepsia é uma condição médica que afeta de 1 a 2% da população mundial, definindo-se como distúrbio crônico do sistema nervoso central (SNC) e tendo como característica principal a manifestação de crises epiléticas recorrentes e espontâneas, as quais resultam da atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica [1]. Uma crise epilética é o resultado de uma descarga elétrica excessiva, súbita e geralmente rápida de um grupo de neurônios que pode estar localizado em qualquer uma das regiões do cérebro. As manifestações clínicas da crise epilética dependerão não só da região onde a descarga se localiza como também de sua possível propagação para áreas cerebrais vizinhas [2]. As crises epiléticas podem ser tão rápidas que passam despercebidas ou tão prolongadas que exigem atendimento em emergência médica, podendo acarretar sequelas graves [2]. O dano cerebral induzido pelo *status epilepticus*, um tipo de crise epilética, tem sido frequentemente relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica, principalmente através da hiperestimulação de receptores do tipo NMDA, levando a um excessivo influxo de íons Ca^{+2} no neurônio, principalmente através dos receptores NMDA extrasinápticos, por canais acoplados a estes receptores ou por ativação de canais dependente de voltagem, com subsequente morte neuronal [3].

As epilepsias são observadas principalmente em crianças. Tal fato se deve a características físicas e químicas do cérebro imaturo que facilitam a ocorrência das crises. A importância médica desta patologia acentua-se ainda mais pelo fato de que ela tende a durar por toda a vida, podendo acarretar profundas consequências psicopatológicas e sociais [4]. Com o aumento da longevidade da população mundial, tem se verificado crescimento da incidência de epilepsia entre os idosos em função das doenças próprias dessa faixa etária [2].

A maioria dos modelos descritos e dos projetos de pesquisa acerca de novas drogas antiepiléticas objetiva o desenvolvimento de terapias para a população adulta, e a maioria das drogas antiepiléticas disponíveis comercialmente não possuem indicações nem informações sobre sua farmacocinética e efeitos colaterais em crianças. Além disso, alguns relatos indicam que o percentual de pessoas com epilepsia e não beneficiadas pode ser de até 20%. Apesar de todo o avanço tecnológico e midiático, a epilepsia continua a representar um

problema de discriminação, acarretando dificuldades na educação, no emprego, na vida social e comunitária dos pacientes com este distúrbio [2].

1.2. *STATUS EPILEPTICUS*

Basicamente, as crises epiléticas são classificadas em crises parciais (CP), também denominadas de focais, e crises generalizadas (CG), sendo a diferença mais importante entre elas a perda de consciência. No entanto, uma outra classificação é utilizada para descrever crises que duram mais de 30 minutos ou crises sucessivas nas quais não há recuperação do nível da consciência entre elas. Este tipo de crise é definido como “*Status Epilepticus*” (SE), também chamado de “estado de mal epilético”, o qual constitui uma das urgências neurológicas, especialmente na infância [2].

Estudos demonstram que o SE tardio, com duração superior a 30 minutos, além de causar danos cerebrais irreversíveis, torna-se irresponsivo (refratário) aos antiepiléticos tradicionais disponíveis no mercado atualmente (farmacoresistência). Esta farmacoresistência aos antiepiléticos tradicionais tem sido amplamente reportada em estudos envolvendo animais e também seres humanos. Walton and Treiman, (1988) [5] mostraram que, em animais submetidos ao SE induzido por LiCl-pilocarpina, o controle das crises convulsivas torna-se mais difícil a medida que aumenta a duração da crise. Kapur and Macdonald (1997) [6] reportaram uma diminuição da potência anticonvulsivante do diazepam em um modelo de SE induzido em ratos. Além disso, Jones et al. (2002) [7] observaram que, em animais submetidos ao SE induzido por LiCl-pilocarpina, a administração de diazepam e fenobarbital logo após o início da crise reverte, de maneira dose-dependente (ED_{50} de 1,6 mg/kg), a progressão do status epilepticus. Entretanto, quando estes fármacos são administrados 10 minutos após o início da crise a maioria dos animais (92% ou mais) não exibe recuperação. Em humanos, estudos clínicos também demonstram que o tratamento do SE com diazepam e fenitoina é satisfatório (80% dos pacientes respondem ao tratamento) somente quando estes fármacos são administrados até 30 min após o início da crise. No entanto, se administrados após este período de tempo, sua eficácia diminui em 50%.

1.3. GLUTAMATO

O glutamato é considerado o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, onde participa de inúmeros eventos fisiológicos e plásticos tais como: memória e aprendizado [8], desenvolvimento e envelhecimento [9], adaptação ambiental [10], proliferação e migração celular [11]. No entanto, quando presente em altas concentrações na fenda sináptica por um longo período, pode ser uma potente neurotoxina [12] e sua excitotoxicidade tem sido implicada na patogênese de inúmeros transtornos agudos e crônicos do SNC [13-21].

1.4. CICLO GLUTAMATO-GLUTAMINA

No SNC há uma importante interação entre vasos sanguíneos, neurônios e astrócitos, através da qual é realizada a regulação do metabolismo do glutamato, glutamina e amônia. Esse processo é definido como ciclo glutamato-glutamina e é um processo metabólico crítico em relação ao metabolismo de glutamato global no cérebro. Tendo neurônios pré-sinápticos como ponto de partida, o ciclo inicia com a liberação de glutamato de vesículas secretoras pré-sinápticas em resposta à propagação de um potencial de ação ao longo do axônio. O processo de fusão da vesícula secretora de glutamato com a membrana neuronal é um processo dependente de Ca^{+2} . O glutamato liberado na fenda sináptica deve ser rapidamente removido a fim de evitar-se hiperexcitação dos neurônios pós sinápticos. O glutamato presente na fenda sináptica pode ser removido por três diferentes processos. Esse aminoácido pode ser captado pelo neurônio pós-sináptico, ele pode ser recaptado pelo neurônio pré-sináptico que o liberou ou ele pode ser captado por astrócitos. O potencial de membrana dos astrócitos é inferior ao dos neurônios, o que favorece a captação do glutamato pelos astrócitos. A captação de glutamato por astrócitos é mediada tanto por sistema Na^{+} -dependente como por sistema Na^{+} -independente, sendo o sistema dependente de Na^{+} o predominante no SNC. Há dois transportadores de glutamato dependentes de Na^{+} expressos em astrócitos, o EAAT1 (Excitatory aminoacid transporter 1; também chamado de GLAST) e o EAAT2 (também chamado de GLT-1).

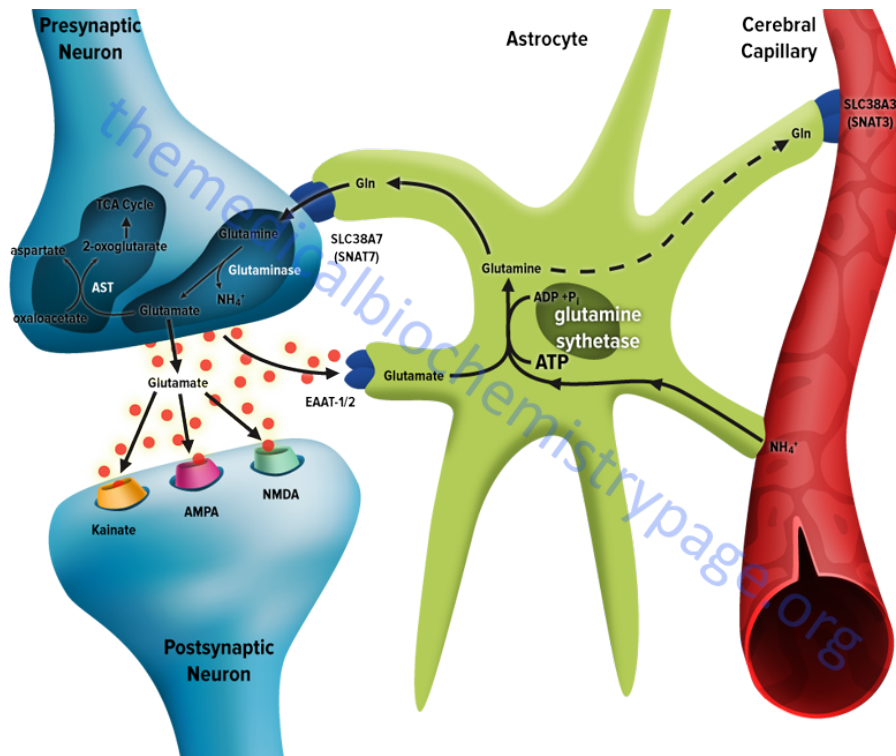


Figura 1: Ilustração do ciclo glutamato-glutamina. O glutamato é liberado na fenda sináptica em resposta à propagação de um potencial de ação no axônio. O glutamato pode ser removido da fenda por captação pelo neurônio pós-sináptico, recaptação pelo neurônio pré-sináptico que o liberou ou captado por astrócitos.

© 1996–2013 themedicalbiochemistrypage.org, LLC

Após a captação de glutamato, os astrócitos possuem a habilidade de exportar esse aminoácido para o sangue através da sua liberação em capilares que estejam em contato com os astrócitos. Outro destino do glutamato captado pelos astrócitos é a sua conversão à glutamina. A glutamina serve como um reservatório de glutamato, mas como um composto não neuro ativo. Os astrócitos convertem glutamato em glutamina rapidamente com o auxílio da enzima glutamina sintetase. A glutamina produzida pelos astrócitos é captada pelos neurônios via sistema Na^+ -dependente e por sistema Na^+ -independente. O principal transportador de glutamina, tanto em neurônios excitatórios como em inibitórios é o transportador SLC38A7 (também chamado de SNAT7). A glutamina captada pelos neurônios é hidrolisada a glutamato e amônia pela ação de uma enzima mitocondrial, a glutaminase dependente de fosfato (PAG – phosphate-dependent glutaminase).

Glutamato, liberado como um neurotransmissor, é recaptado pelos neurônios pré-sinápticos ou captado por astrócitos, onde é convertido em glutamina, liberada aos neurônios, onde é convertida novamente a glutamato, processo que representa o ciclo completo glutamato-glutamina. Os transportadores de glutamato são extremamente importantes na

recaptação deste neurotransmissor a fim de evitar a excessiva estimulação dos receptores glutamatérgicos e consequente excitotoxicidade [4]. Recentes estudos em humanos [21] e em ratos transgênicos [22] indicaram que alterações nos transportadores de glutamato podem resultar em fenótipos epiléticos.

1.5. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS

Existem três receptores ionotrópicos expressos em neurônios pós-sinápticos glutamatérgicos nos quais se liga o glutamato liberado por neurônios pré-sinápticos. Esses receptores são kainato, AMPA (2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic) e NMDA (*N*-methyl-D-aspartate). Existem ainda diversos tipos de subunidades para cada um desses receptores glutamatérgicos ionotrópicos. A ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos ocorre pela ligação do glutamato aos receptores, onde o canal iônico do receptor é aberto para a passagem de sódio e potássio, e algumas vezes de cálcio [23]. Os receptores AMPA são os principais mediadores da neurotransmissão excitatória rápida e permite a passagem de sódio e potássio quando ativado. Os receptores NMDA são os principais receptores envolvidos em processos de plasticidade celular, resultante da passagem de íons cálcio para o interior do neurônio. O cálcio atua como um segundo mensageiro que ativa mecanismos celulares específicos relacionados a mudanças estruturais e funcionais no neurônio [24].

1.6. RECEPTORES NMDA

O receptor NMDA pode ser formado por 3 famílias de subunidades, GluN1 (também chamada de NMDAR1), GluN2 (NMDAR2) e mais recentemente descoberta a GluN3 (NMDAR3). Existem 4 subunidades GluN2 (GluN2A-D) codificadas por genes distintos. Apesar de haver apenas um gene codificando para a subunidade GluN1, múltiplas isoformas dessa subunidade são geradas através de splicing alternativo. O receptor NMDA funcional é composto de um heterotetrâmero, sempre contendo uma subunidade GluN1. Tipicamente, os

receptores NMDA são formados por duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2. Podem existir tetrâmeros formados por GluN1/GluN2, GluN1/GluN2/GluN3 ou GluN1/GluN3. Os receptores NMDA são ativados pela ligação simultânea de glutamato e glicina, a qual funciona como um co-agonista e a ligação de ambos neurotransmissores é necessária para que ocorra a ativação desse receptor. A glicina se liga à subunidade GluN1 e o glutamato à subunidade GluN2. A ligação de glutamato nos receptores NMDA resulta em um influxo de cálcio em neurônios pós-sinápticos levando à ativação de cascatas sinalizadoras.

Os receptores NMDA são proteínas integrais de membrana, compostos por quatro subunidades, formando um poro no centro do canal iônico, com permeabilidade altamente seletiva para os cátions K^+ , Na^+ e Ca^{+2} [25]. Durante o potencial de repouso, os canais do NMDAR estão normalmente bloqueados por íons Mg^{+2} , o que impede a passagem de outros íons. É necessário que ocorra uma despolarização da membrana neuronal para a liberação do íon Mg^{+2} para a ativação do receptor além da ligação de glutamato e glicina. A entrada de íons pelo canal de NMDAR é considerada dependente de voltagem, já que a ativação desse receptor depende tanto da ligação do glutamato quanto da despolarização da membrana neuronal, para que o canal seja desobstruído pelo Mg^{+2} .

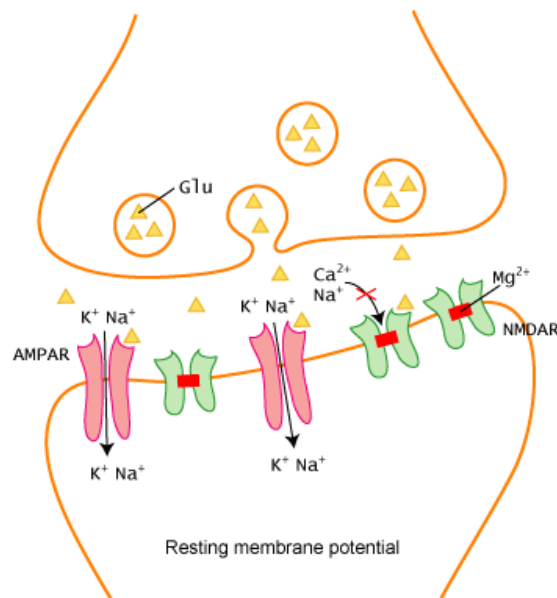


Figure 2: Ilustração da captação glutamato pelo neurônio pós-sináptico, através dos receptores NMDA AMPA e NMDA. Durante o potencial de repouso, os canais do NMDAR estão bloqueados por íons Mg^{+2} .

1.7. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA

Os receptores NMDA possuem ampla distribuição no SNC, com máxima expressão na região CA1 do hipocampo [26]. A expressão das diferentes subunidades do NMDAR varia de acordo com a estrutura do SNC e sofrem alteração ao longo do desenvolvimento cerebral. Em sinapses, a subunidade GluN2A (NR2A) é expressa principalmente no botão sináptico (NMDAR sináptico) e a subunidade GluN2B (NR2B) é expressa na extra-sinapse (NMDAR extrasináptico) [24]. Estudos sugerem que os NMDAR possuem diferentes funções nas suas diferentes localizações, não só devido a sua localização como também devido a duas diferentes subunidades [24, 27, 28].

1.8. RECEPTORES NMDA EXTRASSINÁPTICOS

Estudos anteriores demonstraram que receptores NMDA extrassinápticos, os qual contém a subunidade GluN2B (NR2B), são responsáveis pelo influxo de Ca^{+2} envolvido na sinalização de morte celular [28]. Neste caso, torna-se de extrema importância a investigação da eficácia de antagonistas específicos de receptores NMDA contendo a subunidade GluN2B, em prevenir a morte neuronal e as alterações comportamentais causadas pelas crises epiléticas do tipo *status epilepticus*.

1.9. NEUROPROTEÇÃO COM ANTAGONISTAS DE NMDAR

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que animais submetidos ao SE e tratados com cetamina (um antagonista não-seletivo e não-competitivo de receptores NMDA) durante a convulsão apresentaram diminuição total ou parcial no número de neurônios em degeneração do que os animais que não receberam a droga. Além disso, também foi verificada uma diminuição nas alterações comportamentais observadas na idade adulta a qual pode estar relacionada a diminuição da morte neuronal, indicando um envolvimento dos receptores do tipo NMDA na morte neuronal causada pelo SE. Esses estudos indicam um possível papel neuroprotetor de antagonistas não seletivos e não competitivos de NMDAR.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos extrasinápticos do tipo NMDA, CP-101 606 e CI-1041, no tratamento de crises epiléticas prolongadas (*status epilepticus*) induzidas por LiCl-pilocarpina em ratos jovens.

2.2. Objetivos específicos

Induzir crises epiléticas prolongadas (*status epilepticus*) em ratos jovens através do modelo de LiCl-pilocarpina.

Investigar os efeitos da cetamina, antagonista não-seletivo e não-competitivo de receptores NMDA, sobre o comportamento convulsivo dos animais submetidos ao *status epilepticus*.

Investigar os efeitos dos antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos extrasinápticos do tipo NMDA, CP-101,606 e CI-1041, sobre o comportamento convulsivo dos animais submetidos ao *status epilepticus*.

Investigar, 7 dias após o *status epilepticus*, os efeitos dos antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos extrasinápticos do tipo NMDA, CP-101,606 e CI-1041, sobre o dano neuronal induzido pelo *status epilepticus* durante períodos iniciais do desenvolvimento.

ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Efeito de antagonistas de receptores NMDA extrasinápticos sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos submetidos ao modelo experimental de *status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina” foi formatado conforme as normas para publicação junto ao periódico “*Epilepsy & Behavior*”.

ABSTRACT

Epilepsy is a group of neurologic disorders characterized by recurrent seizures that results from excessive, abnormal and hypersynchronous neural activity. *Status epilepticus* (SE) is defined as an epileptic seizure of 30 minutes or successive seizures in which the levels of the patient's awareness are not recovered between them. There are around 50 million people in the world that are epileptic and the children and elderly's population are the most affected. When SE occurs during childhood can lead to neuronal death and to behavioral and cognition problems in adulthood. Neuronal death can be considered the cause for this alterations observed in epileptic patients.

One this study we aimed to understand the effect of extra synaptic NMDA receptors antagonists on neuronal death in young rats subjected to SE induced by LiCl-pilocarpine model. Sixteen natal days Wistar rats received pilocarpine injection (60mg/kg i.p.) 12-18h after LiCl (3mEq/kg i.p.) injection. Fifteen minutes after pilocarpine injection, animals received ketamine, a non-selective NMDAR antagonist, or extra synaptic NMDAR antagonists injections, CP-101 606 or CI-1041, to investigate the effect of these drugs on neuronal death induced by SE. It was observed, on this study, that SE induced on young rats leads to an expressive neuronal loss on CA1 hippocampal subfield, MePV amygdala subfield and VM (ventral medial nucleus) and VPM (ventral posteromedial nucleus) thalamus subfield, 7 days after SE. Ketamine administration was able to moderate the epileptic seizures and to prevent neuronal death. In contrast with ketamine treatment, specific GluN2B NMDAR subunit antagonists (CP-101 606 or CI-1041) couldn't stop the epileptic seizure. However, neuronal death on amygdala, hippocampus and thalamus was prevented with CI-1041 administration. CP-101 606, on the other hand, wasn't able to prevent neuronal death, what can indicate a pharmacological and/or kinetic difference of both NMDAR antagonists.

Keywords: epilepsy, *status epilepticus*, NMDA receptor, extrasynaptic NMDAR, NMDAR antagonist

1. INTRODUCTION

Glutamate is considered the main excitatory amino acid of mammals central nervous system (CNS), and it has been demonstrated its implication in several physiologic and plastic processes, such as memory and learning [8], development and senescence [9], environmental adaptability [10], cell proliferation and migration [11]. However, when present in high concentrations at the synaptic gap for a long time period, it can be a potent neurotoxin [12] and its excitotoxicity has been implied on the pathogenesis of several chronic and acute disorders from CNS [13-21].

Glutamate transporters are extremely important on the uptake of this neurotransmitter in order to avoid excessive stimulation of glutamatergic receptors and consequently excitotoxicity [4]. Recent studies in humans [21] and in transgenic rats [22] indicated that alterations in glutamate transporters could cause epileptic phenotypes. Epilepsy is a medical condition that affects around 1-2% of the world's population and it can be defined as a CNS chronic disorder. Spontaneous and recurrent epileptic seizures are the main characteristics of epilepsy, which result from excessive, abnormal and hypersynchronous neuronal activity [1]. Epilepsies are commonly observed in children, because of the chemical and physical characteristics of the immature brain that facilitate the seizures occurrence. Epileptic seizures can be classified as partial seizures, also known as focal, and as generalized seizures. The main difference between this types of seizures is the loss of consciousness. Another classification can also be used to describe seizures that last more than 30 minutes or successive seizures where there is no conscience recovery between them. This type of seizure is defined as "*Status Epilepticus*" (SE) [2].

Several studies have demonstrated that late SE, that last more than 30 minutes, besides causing irreversible brain damage, usually becomes unresponsive to traditional antiepileptic drugs available on the market today (drug resistance) [5-7]. Nevertheless, when these drugs are administered 10 minutes after the onset of the seizure, most of the animals (92% or more) don't show recovery. In humans, clinical studies also show that SE treatment with diazepam and phenytoin is satisfactory (80% of the patients reacts to the treatment) only when these drugs are administered till 30 minutes after the seizure onset. However, if the drugs are administered after this time period, its effectiveness decreases 50%.

The neuronal death caused by SE can be the cause of the cognitive deficit and behavioral alterations observed in epileptic patients. The ionotropic glutamatergic receptors

excessive activation, mainly NMDAR, leads to an increase of free cytosolic Ca^{+2} concentration, due to an influx of this same ion through channels attached to these receptors or by voltage dependent channels activation, with subsequent neuronal death [3]. Studies from our research group have demonstrated that animals submitted to SE and treated with ketamine (a non-selective and non-competitive NMDA receptor antagonist) during seizure presented a total or partial decrease of neurons in degeneration when compared to animals that didn't receive this drug. Besides it was also verified a decrease on the behavioral alterations observed at adulthood, which can be related to a decrease on neuronal death. This can indicate an involvement of NMDAR on the neuronal death caused by SE.

Previous studies have shown that extrasynaptic NMDAR, which are composed mainly by subunits NR1 and NR2B (GluN1 and GluN2B), are responsible for Ca^{+2} influx involved on cellular death signalization [28]. Based on this context, the evaluation of specific NMDAR antagonists that selectively block NMDAR containing NR2B (GluN2B) subunit efficiency on preventing neuronal death and behavioral alterations caused by SE epileptic seizures type becomes of extreme importance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Research location

This study was developed at the Biochemistry department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, in Porto Alegre – RS.

2.2. Subjects

Young Wistar rats (15 postnatal days – PND15) were used in this study. The day of birth was defined as day 0. The animals were divided in 4 groups: SE+SAL (treated with LiCl-pilocarpine + saline after 15 minutes), SE+KET (treated with LiCl-pilocarpine + ketamine after 15 minutes), SE+CP-101 606 (treated with LiCl-pilocarpine + CP-101 606 after 15 minutes) and SE+CI-1041 (treated with LiCl-pilocarpine + CI-1041 after 15 minutes). The sample size was based on previous studies from our research group [29], and on the test described by Jaques [30].

2.3. Induction of *status epilepticus*

At 15 post natal days (P15) animals were injected with an intraperitoneal injection (i.p.) of LiCl (3mEq/kg – Nuclear, Brasil) 12-18h before pilocarpine (60 mg/kg – RBI, USA) i.p. injection on P16 (Hirsch et al., 1992; Sankar et al., 1998). The volume of injection was 5ml/kg of body weight for all solutions. Fifteen minutes after pilocarpine administration animals received CP-101,606 (10 mg/kg i.p. – SE+CP group), CI-1041 (10 mg/kg i.p. – SE+CI group), ketamine (22.5mg/kg i.p. – SE+KET group) or saline (0.9% i.p. – SE+SAL group). Animal were put in cages at 34°C, nest temperature, for behavioral observation of seizures, for 1.5h. Animals received i.p. injections of HBSS supplemented with 1.1mM glucose 1.5h, 4h, 7h, 24h, 36h, 48h and 60h after SE induction. The body weight was

accessed daily from P15 to P23, the last experimental day, to detect a possible weight loss due to SE induction.

2.4. Histological analysis

Animals were prepared for histological analysis 7 days after SE induction. Rats were anesthetized i.p. with ketamine (90mg/kg) and xylazine (12mg/kg) and perfused through the heart with 100mL of ice-cold saline phosphate buffer 0,3M (pH7,4), followed by an ice-cold fixative solution 4% paraformaldehyde in 0,1M phosphate buffer solution (pH7,4). Brains were removed and immersed overnight in a fixative solution 4% paraformaldehyde in 0,1M phosphate buffer solution (pH7,4) and then transferred to 30% sucrose solution until the brains sank to the bottom of the chamber. Coronal slices (50 μ m) were obtained using a vibroslicer and then submitted to the following histological analysis.

2.5. Fluoro-Jade C staining

Fluoro-jade C staining was performed as described by Schmued et al. [31] for neurodegeneration analysis. Coronal slices were mounted onto gelatin-coated slides and dried at room temperature overnight. After slides were immersed in xylene for 10 minutes and again in xylene for 10 minutes. Then the slides were transferred to a solution consisting of 100% ethanol for 3 minutes followed by 2 minutes in 70% ethanol. The slides were immersed in distilled water for 2 minutes and then in a 0.06% potassium permanganate solution for 10 minutes. After the slides were put in distilled water for 1 minute and then in a 0.0001% Fluoro-Jade C solution (Chemicon, INC., USA), rinsed 3 times of 1 minute each in distilled water and dried overnight and dehydrated in xylene for 2 minutes. Sections were analyzed using a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope. Positive neuronal cells were counted manually. Accordingly to Wang [32], cells exhibiting bright green fluorescence and profiles of neuronal somas were counted while FJC positive fragments were not counted.

2.6. Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed with GFAP (Glial fibrillary acidic protein) e Iba-1/NeuN (neuronal nuclei) antibodies. Iba-1 is specifically expressed in microglia and is upregulated during the activation of these cells. Sections were put in 24 wells plates with 1X PBS. Slices were block for 1h with blocking buffer (10X PBS, bovine serum and triton x-100). The solution was removed and the slices were incubated with the primary antibody diluted 1:500 for 24h at 4°C. The slices received either GFAP antibody or Iba-1/NeuN antibodies. After slices were washed 3 times for 5 minutes each with 1X PBS. Following this secondary antibody diluted 1:1000 was applied to the wells, protected from light, for 2h in room temperature. Then wells were washed again 3 times for 5 minutes each with 1X PBS and mounted on gelatin-coated slides and dried for 24h. On the next day the slices were stained for DAPI, a marker for nuclei, for 25 minutes in a DAPI solution, protected from light. Slides dried at room temperature overnight before analysis by a Olympus FluoView confocal microscope.

2.7. Statistical analysis

The body weight is expressed as average \pm SD and was analyzed by ANOVA of repeated measures followed by Tukey's test for independent samples. Histological analysis are expressed as mean \pm S.E.M. and were analyzed by Kruskal-Wallis test.

2.8. Ethical considerations (for animal research)

All procedures were approved by the Ethic Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n°22213) and are in accordance with the "Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal" standards.

3. RESULTS

3.1. Convulsive pattern of *status epilepticus*

The convulsive pattern presented by LiCl-pilocarpine treated animals was similar to that described by [29]. After the systemic administration of LiCl-pilocarpine, animals presented defecation, salivation, body tremor and scratching within 2 to 8 minutes. This behavioral pattern progressed within 8 to 13 minutes to increased levels of motor activity, culminating in SE in all animals. SE was characterized by sustained orofacial automatisms, salivation, chewing, forelimb clonus, loss of righting reflex and falling.

Animals that received ketamine (SE+KET group) after SE onset, a non-specific and non-competitive NMDAR antagonist, presented symptoms of anesthesia and sedation after the drug administration and a decreased intensity of the epileptic seizure but without righting recovery.

Blockage of NMDAR containing GluN2B subunit by CP-101 606 (SE+CP group) or CI-1041 (SE+CI group) after SE onset did not affect the behavioral pattern of seizure, when compared with animals from SE+SAL group.

3.2. Effect of SE induction on mortality

It was not observed a statistical difference on animal's mortality rate among groups (data not shown).

3.3. Body weight reduction after SE induction

The animals from all groups (SE+SAL, SE+KET, SE+CP and SE+CI) presented a weight loss one day after seizure onset. In the subsequent days, animals presented a similar weight gain (data not shown).

3.4. Effect of CP-101,606 and CI-1041 treatment on SE-induced neuronal degeneration

The FJC-positive staining cells showed a bright green color in the somas and fine process with neuronal profiles. Li-Cl-pilocarpine administration induced a massive neurodegeneration in several brain regions, including CA1 hippocampal subfield, thalamus (ventromedial thalamic nucleus – VM and ventral posteromedial thalamic nucleus – VPM) and amygdala (medial amygdaloid nucleus – MePV) 7 days after SE onset. CI-1041 post-SE onset treated group presented an absence of FJC-positive neurons in CA1 hippocampal subfield, amygdala and in the thalamus subfields analyzed. CP-101,606 post-SE onset treated group did not reduce the number of FJC-positive neurons in all brain regions analyzed. It was not observed neuronal death by FJC-positive neurons in all brain regions for KET group (Figure 1). No FJC-positive cells were found in KET group and there was a reduction in the number of FJC-positive cells in CI group (Table 1).

3.5. Effect of CP-101,606 and CI-1041 treatment on astrocytes and microglia activity

Microglia activity was detected with Iba-1 antibody, which is upregulated during activation of these cells. NeuN (neuronal nuclei) is a marker for neurons nuclei and DAPI is a marker for nuclei in general. LiCl-pilocarpine administration induced an expressive increase in microglia activation in all brain areas analyzed: CA1 hippocampal subfield, thalamus (ventromedial thalamic nucleus – VM and ventral posteromedial thalamic nucleus – VPM) and amygdala (medial amygdaloid nucleus – MePV) 7 days after SE onset. Animals that received CP-101 606 also presented an increase in microglia activation in all areas analyzed. It was not observed a excessive microglia activation in all brain regions for animals that received ketamine or CI-1041 after SE induction (Figures 2-5).

Astrocytes activity was detected with GFAP antibody. LiCl-pilocarpine administration induced astrogliosis in all brain areas analyzed. It was also present in animals that received CP-101 606 after SE induction. Animals treated with ketamine or CI-1041 did not show astrogliosis (Figures 6-9).

4. DISCUSSION

In this study we investigated specific NMDAR antagonists containing NR2B (GluN2B) subunit efficiency on preventing neuronal death and behavioral alterations caused by SE epileptic seizures type. Previous studies on our laboratory have shown that young animals submitted to SE and treated with ketamine (a non-selective and non-competitive NMDAR antagonist) during seizure presented total or partial decrease on neuronal death when compared to animals that didn't receive the drug. Besides it was also verified a decrease on behavioral alterations observed on adulthood, which can be related to neuronal death. These studies indicate an involvement of NMDAR on the neuronal death caused by SE and a possible neuroprotective role of non-selective and non-competitive NMDAR. There are also studies that identified that extrasynaptic NMDAR, which contain GluN2B (NR2B), are responsible for the Ca^{+2} influx involved in cellular death signaling [28].

Based on these previous studies, we aimed to investigate the effect of the blockage of NMDAR receptors containing NR2B (GluN2B) subunit on LiCl-pilocarpine-induced neurodegeneration. It was observed, that SE induced on young rats leads to an expressive neuronal loss on CA1 hippocampal subfield, MePV amygdala subfield and VM (ventral medial nucleus) and VPM (ventral posteromedial nucleus) thalamus subfield, 7 days after SE. We confirmed the effect of ketamine administration once it was able to moderate the epileptic seizures and to prevent neuronal death, as found in previous studies from our research group. In contrast with ketamine treatment, specific GluN2B NMDAR subunit antagonists (CP-101,606 or CI-1041) couldn't protect from the epileptic seizure. However, neuronal death on amygdala, hippocampus and thalamus was prevented with CI-1041 administration. This result provides useful information about the mechanism of neuronal death in SE once it shows that GluN2B NMDAR subunit is involved in neuronal death via NMDAR in this type of epilepsy, and that neuronal death can be prevented by the antagonism of this specific NMDAR subunit. CP-101,606, on the other hand, wasn't able to prevent neuronal death, what can indicate a pharmacological and/or kinetic difference of both NMDAR antagonists.

We also investigated the effect of CP-101,606 and CI-1041 treatment on astrocytes and microglia activity. We observed that LiCl-pilocarpine administration induced an expressive increase in microglia activation and astrogliosis in all brain areas analyzed 7 days after SE onset, and that animals that received CP-101,606 also presented an increase in

microglia activation and astrogliosis, indicating an inflammatory process in this brain areas. On the other hand, treatment with ketamine or CI-1041 prevented this inflammatory process once it was not observed microglia activation or astrogliosis. Neuronal death and an intense inflammatory process by astrogliosis and microglia excessive activation were present in the same brain areas as on the same groups of animals (SE+SAL and SE+CP groups) indicating a possible relationship between these two outcomes of SE induction.

5. CONCLUSIONS

These findings suggest that neuronal death caused by induced SE in young rats can occur through NMDAR receptors specifically containing GluN2B subunit, once GluN2B NMDAR subunit antagonists were able to prevent neuronal death when administered after seizure onset. However, this prevention of neuronal death was observed only in animals that received CI-1041 and not in CP-101,606. Based on the fact that both drugs act on the same subunit, GluN2B NMDAR subunit, future studies are needed in order to identify the possible causes for this different outcome. Also our findings suggest that an intense inflammatory process is associated to the neuronal death that occurred in animals from SE+SAL group and in animals treated with CP-101,606. However, more research on these processes is needed to find out whether neurodegeneration caused the inflammatory process or if astrogliosis and microglia excessive activation led to neuronal death.

6. REFERENCES

1. Izquierdo, I. and J.H. Medina, *Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures*. Neurobiol Learn Mem, 1997. **68**(3): p. 285-316.
2. Segovia, G., et al., *Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(1): p. 1-29.
3. Ozawa, S., H. Kamiya, and K. Tsuzuki, *Glutamate receptors in the mammalian central nervous system*. Prog Neurobiol, 1998. **54**(5): p. 581-618.
4. McDonald, J.W. and M.V. Johnston, *Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development*. Brain Res Brain Res Rev, 1990. **15**(1): p. 41-70.

5. Obrenovitch, T.P., et al., *Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox*. Int J Dev Neurosci, 2000. **18**(2-3): p. 281-7.
6. Carlson, H., et al., *Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy*. Neurosci Lett, 1992. **140**(1): p. 30-2.
7. During, M.J. and D.D. Spencer, *Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain*. Lancet, 1993. **341**(8861): p. 1607-10.
8. Lipton, S.A. and P.A. Rosenberg, *Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders*. N Engl J Med, 1994. **330**(9): p. 613-22.
9. Meldrum, B.S., *The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders*. Neurology, 1994. **44**(11 Suppl 8): p. S14-23.
10. Bradford, H.F., *Glutamate, GABA and epilepsy*. Prog Neurobiol, 1995. **47**(6): p. 477-511.
11. Price, D.L., *New order from neurological disorders*. Nature, 1999. **399**(6738 Suppl): p. A3-5.
12. Chapman, A.G., *Glutamate and epilepsy*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1043S-5S.
13. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1007S-15S.
14. Maragakis, N.J. and J.D. Rothstein, *Glutamate transporters in neurologic disease*. Arch Neurol, 2001. **58**(3): p. 365-70.
15. de Oliveira, D.L., et al., *Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine*. Brain Res, 2004. **1018**(1): p. 48-54.
16. Meldrum, B.S., M.T. Akbar, and A.G. Chapman, *Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy*. Epilepsy Res, 1999. **36**(2-3): p. 189-204.
17. Engel, J., Jr., *A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology*. Epilepsia, 2001. **42**(6): p. 796-803.
18. Melo, A.N., Nunes, M. L., et al., *Crises epilépticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas* 2006, São Paulo.
19. Walton, N.Y. and D.M. Treiman, *Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam*. Exp Neurol, 1988. **101**(2): p. 267-75.

20. Kapur, J. and R.L. Macdonald, *Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors*. J Neurosci, 1997. **17**(19): p. 7532-40.
21. Jones, D.M., et al., *Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus*. Epilepsy Res, 2002. **50**(3): p. 301-12.
22. Olney, J.W., *Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(1): p. 101-9.
23. Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, and H. Bading, *Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways*. Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 405-14.
24. de Oliveira, D.L., et al., *Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein*. Epilepsia, 2008. **49**(5): p. 842-52.
25. Jaques, D., *Teaching small groups*. BMJ, 2003. **326**(7387): p. 492-4.
26. Schmued, L.C., C. Albertson, and W. Slikker, Jr., *Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration*. Brain Res, 1997. **751**(1): p. 37-46.
27. Wang, L., et al., *Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining*. Brain Res, 2008. **1241**: p. 157-67.

SUBTITLES:**Table 1 – Number of Fluoro-jade C positive cells (per field)**

NF indicates that FJC-positive cells were not found; * indicates that $p < 0.05$ as compared to SE+SAL group; ** indicates that $p < 0.01$ as compared to SE+SAL group; ^a indicates that p-value is an approximated value; All data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

Figure 1: SE induced neurodegeneration. Coronal slices show a massive neurodegeneration in SE+SAL group. SE+CP group presented similar results. SE+KET and SE+CI show neuroprotection to the brain damage caused by SE induction.

Figure 2: CA1 hippocampus subfield. Iba-1, NeuN and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group presents an expressive increase in microglia activation; SE+CP group also shows an increase, but in a lower level; SE+KET and SE+CI don't show hyperactivation of these cells.

Figure 3: VM (ventromedial nucleus) thalamus subfield. Iba-1, NeuN and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group presents an expressive increase in microglia activation; SE+CP group also shows an increase, but in a lower level; SE+KET and SE+CI don't show hyperactivation of these cells.

Figure 4: VPM (ventroposteromedial nucleus) thalamus subfield. Iba-1, NeuN and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group presents an expressive increase in microglia activation; SE+CP group also shows an increase in microglia activation; SE+KET and SE+CI don't show hyperactivation of these cells.

Figure 5: MePV amigdala subfield. Iba-1, NeuN and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group presents an expressive increase in microglia activation; SE+CP group also shows an increase in microglia activation; SE+KET and SE+CI don't show hyperactivation of these cells.

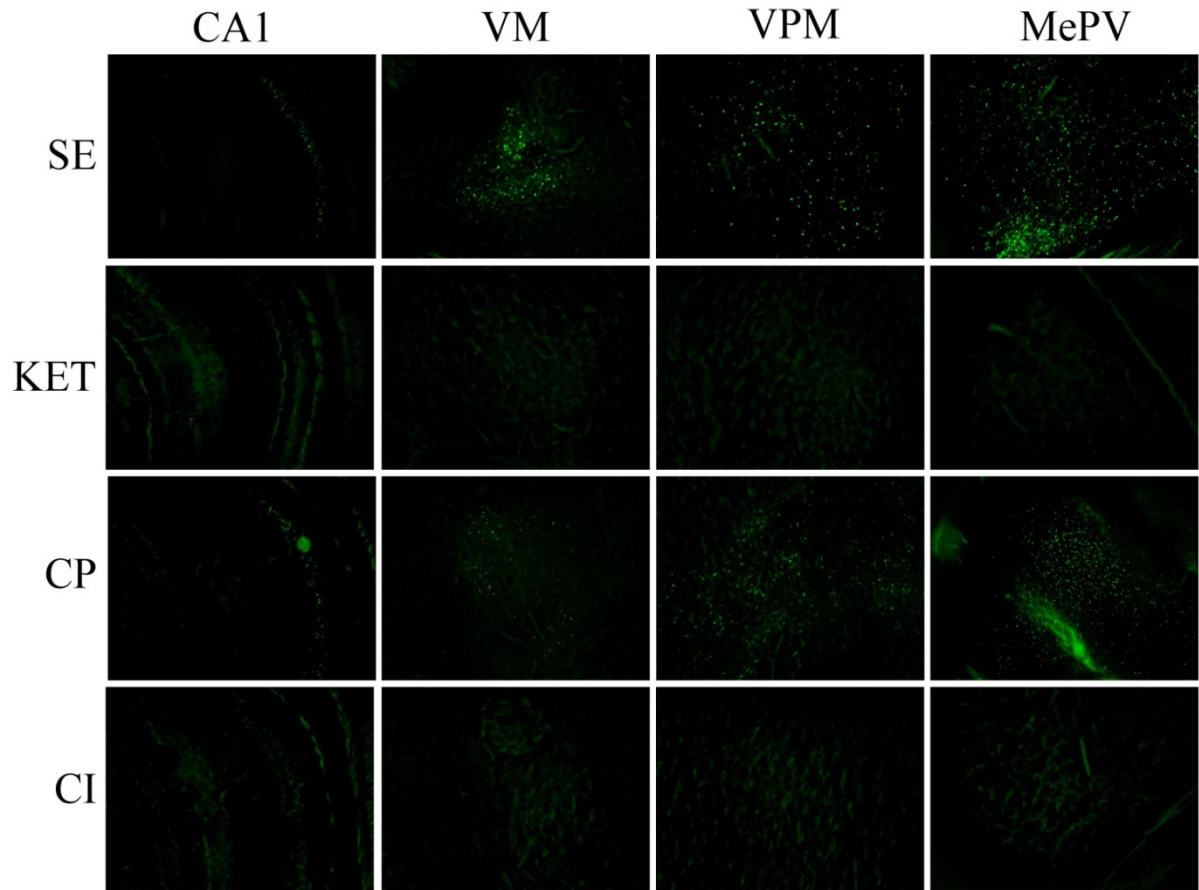
Figure 6: CA1 hippocampus subfield. GFAP and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group and SE+CP groups presents astrogliosis; SE+KET and SE+CI don't show astrogliosis.

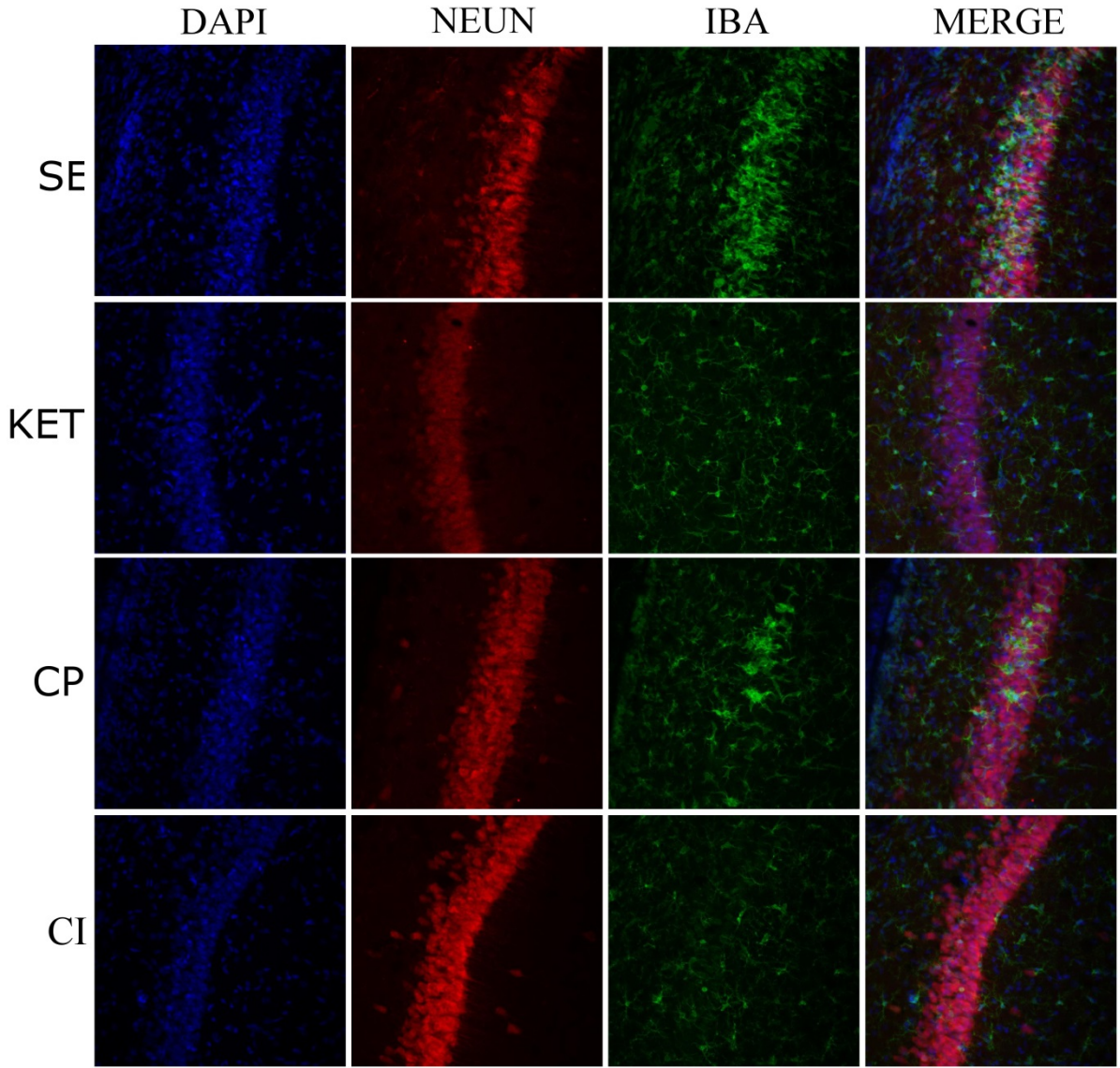
Figure 7: VM (ventromedial nucleus) thalamus subfield. GFAP and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group and SE+CP groups presents astrogliosis; SE+KET and SE+CI don't show astrogliosis.

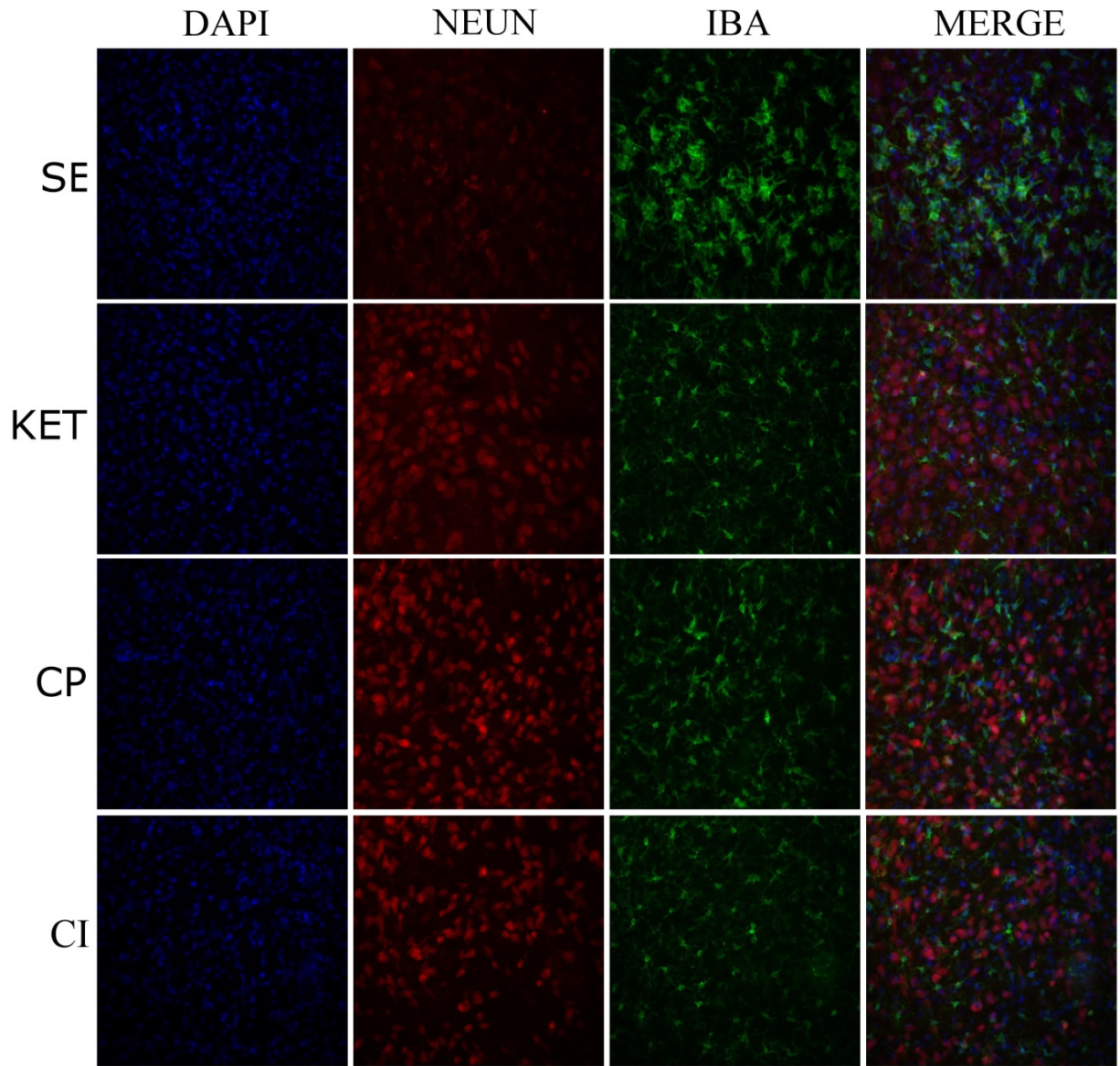
Figure 8: VPM (ventroposteromedial) thalamus subfield. GFAP and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group and SE+CP groups presents astrogliosis; SE+KET and SE+CI don't show astrogliosis.

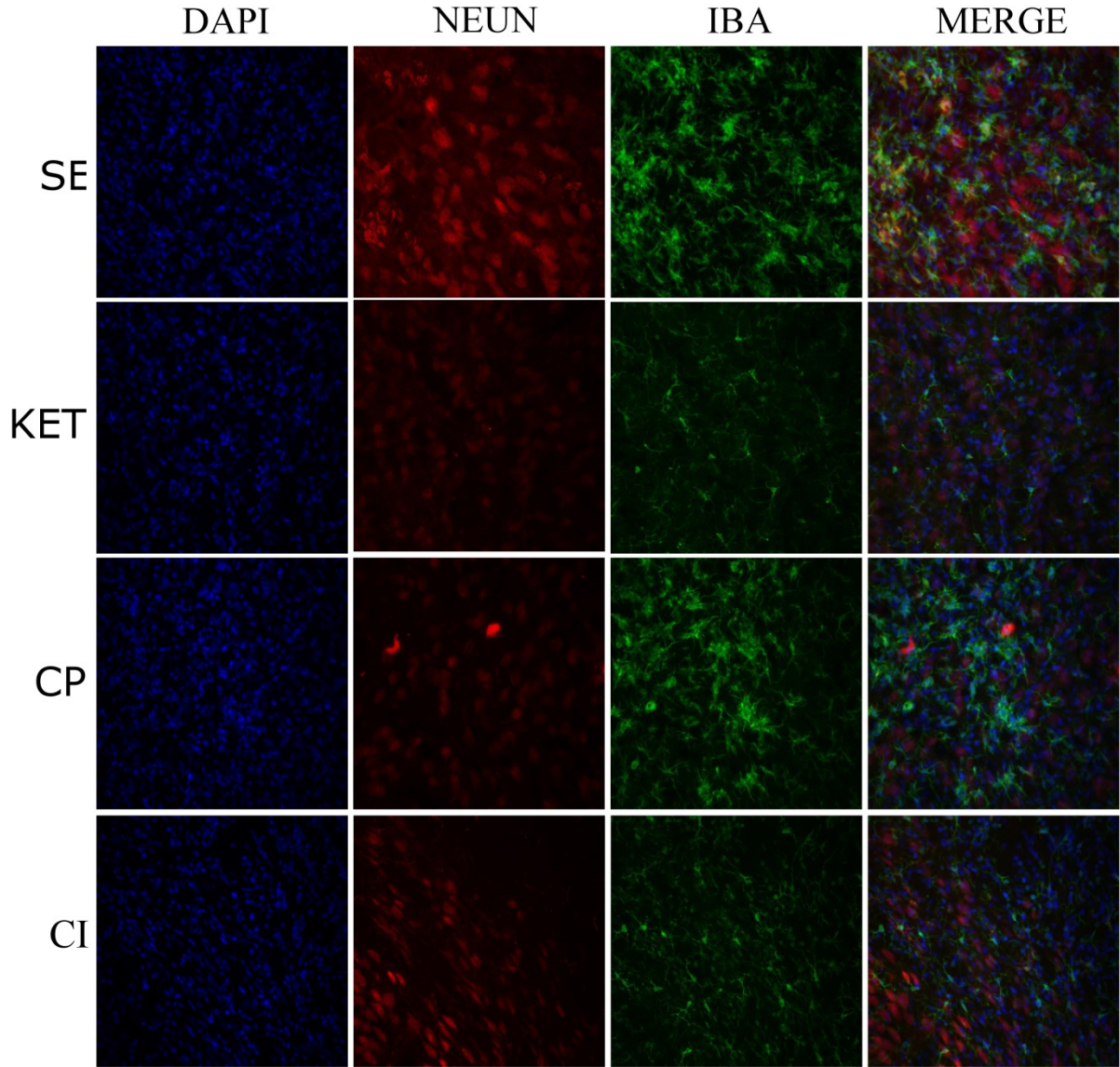
Figure 9: MePV amigdala subfield. GFAP and DAPI immunofluorescence. SE+SAL group and SE+CP groups presents astrogliosis; SE+KET and SE+CI don't show astrogliosis.

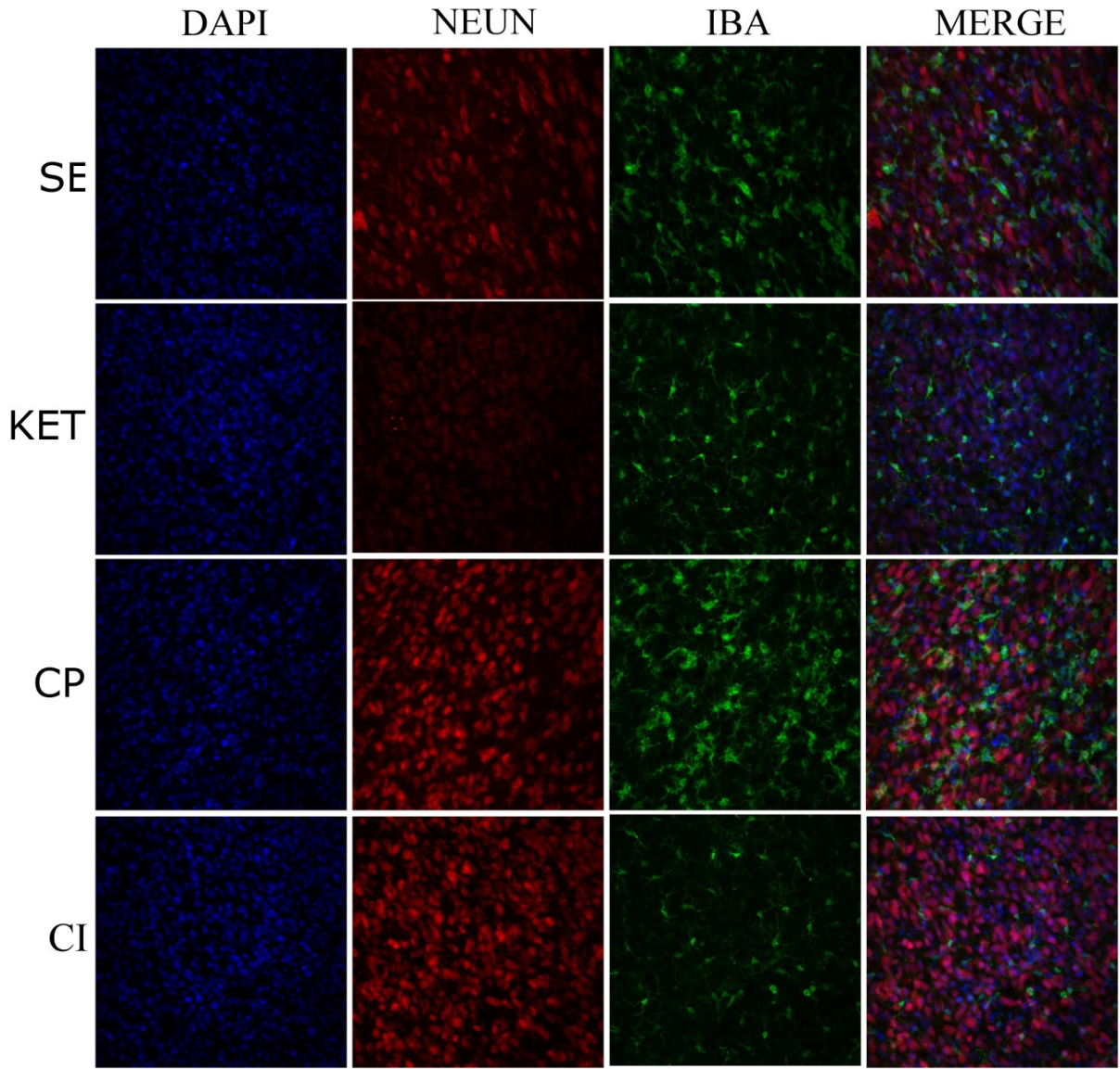
Group	Brain structures			
	CA1	VM	VPM	MePV
SE+SAL	19.33±7.37	109.10±17.63	151.10±39.54	303.20±104.90
SE+KET	NF**	NF**	NF**	NF**
SE+CP	10.50±7.03	76.10±13.46	105.50±21.73	319.90±98.70
SE+CI	NF**	2.58±2.58**	11.58±7.83*	NF*
Kruskal-Wallis statistic	16.65	19.02	17.81	15.78
p-value	0.0008 ^a	0.0003 ^a	0.0005 ^a	0.0013 ^a

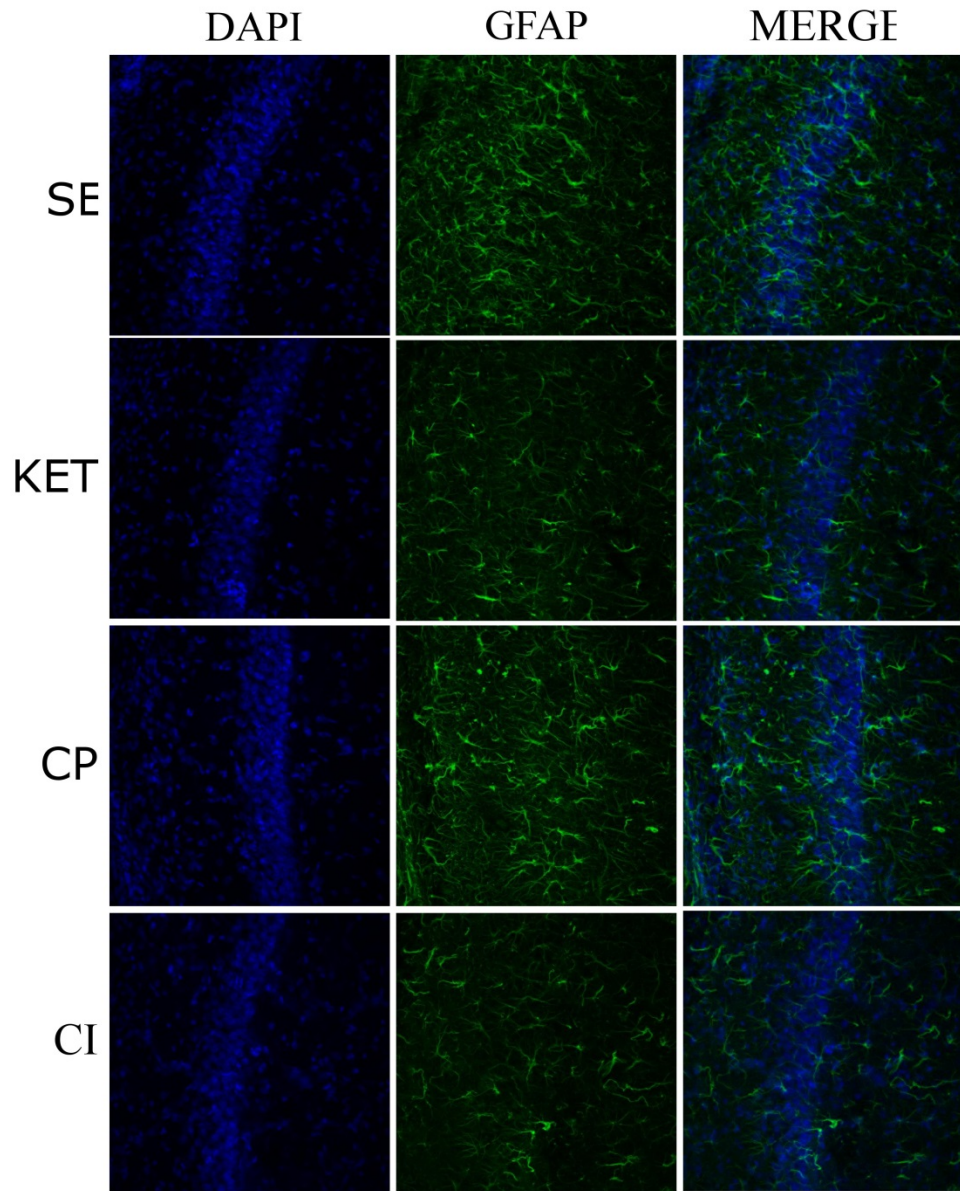


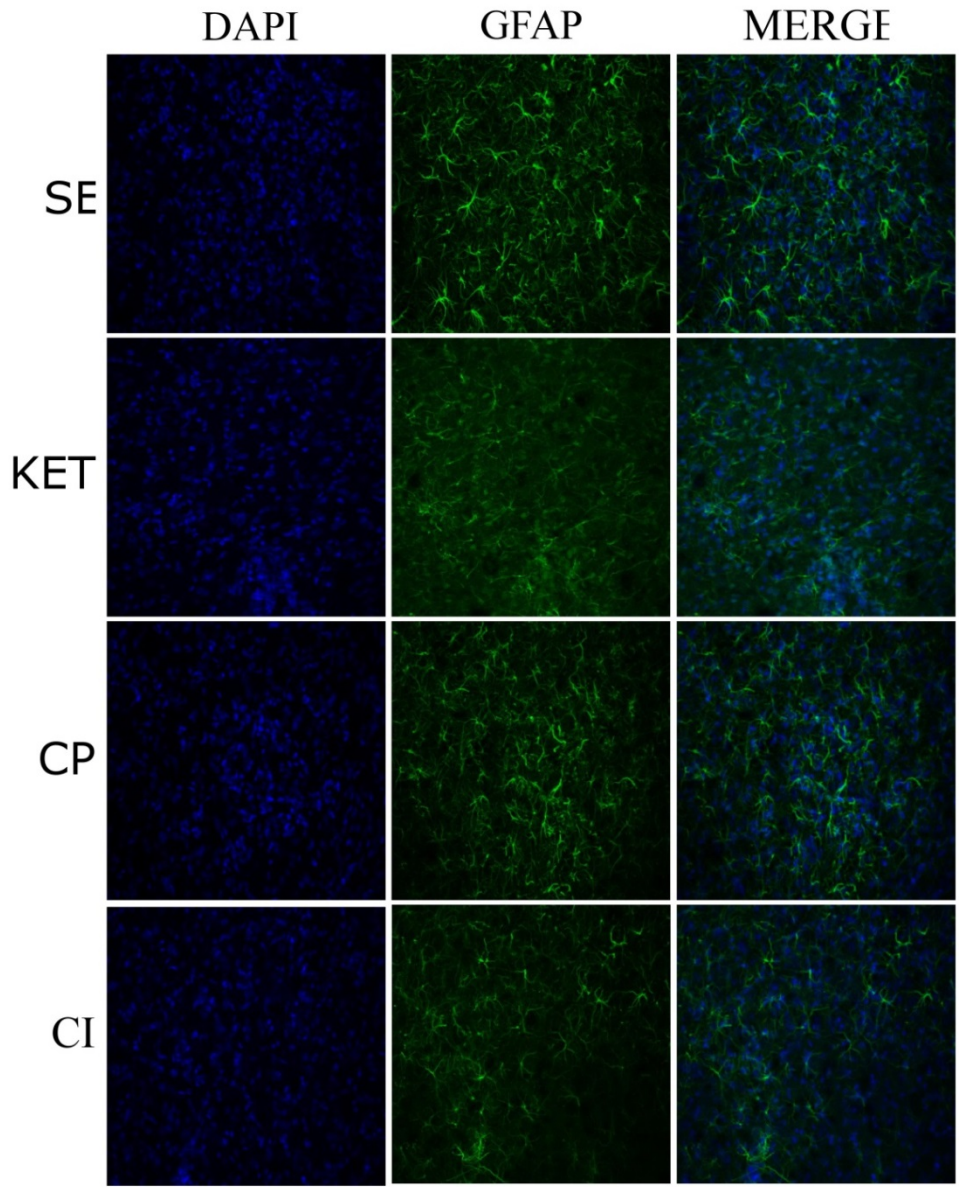


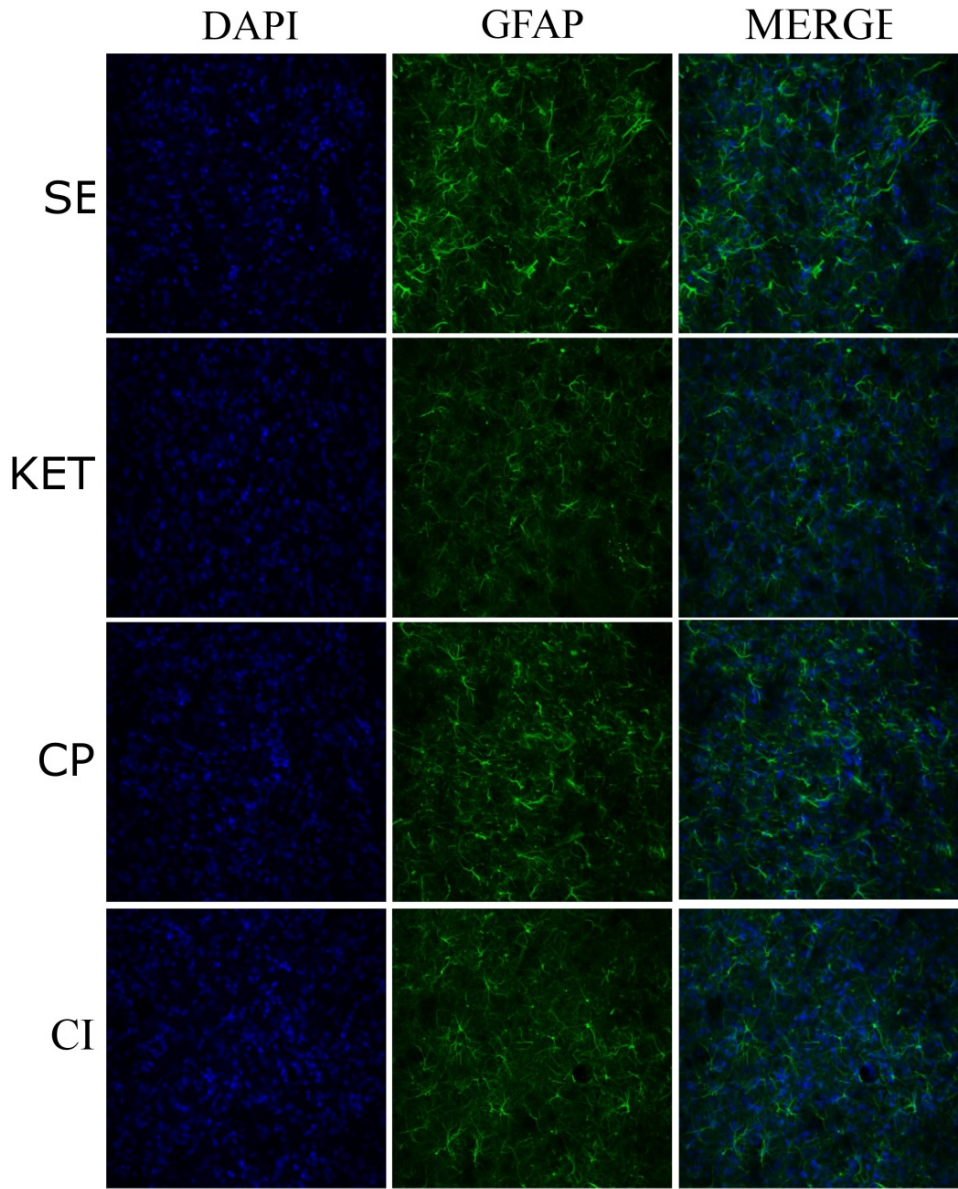


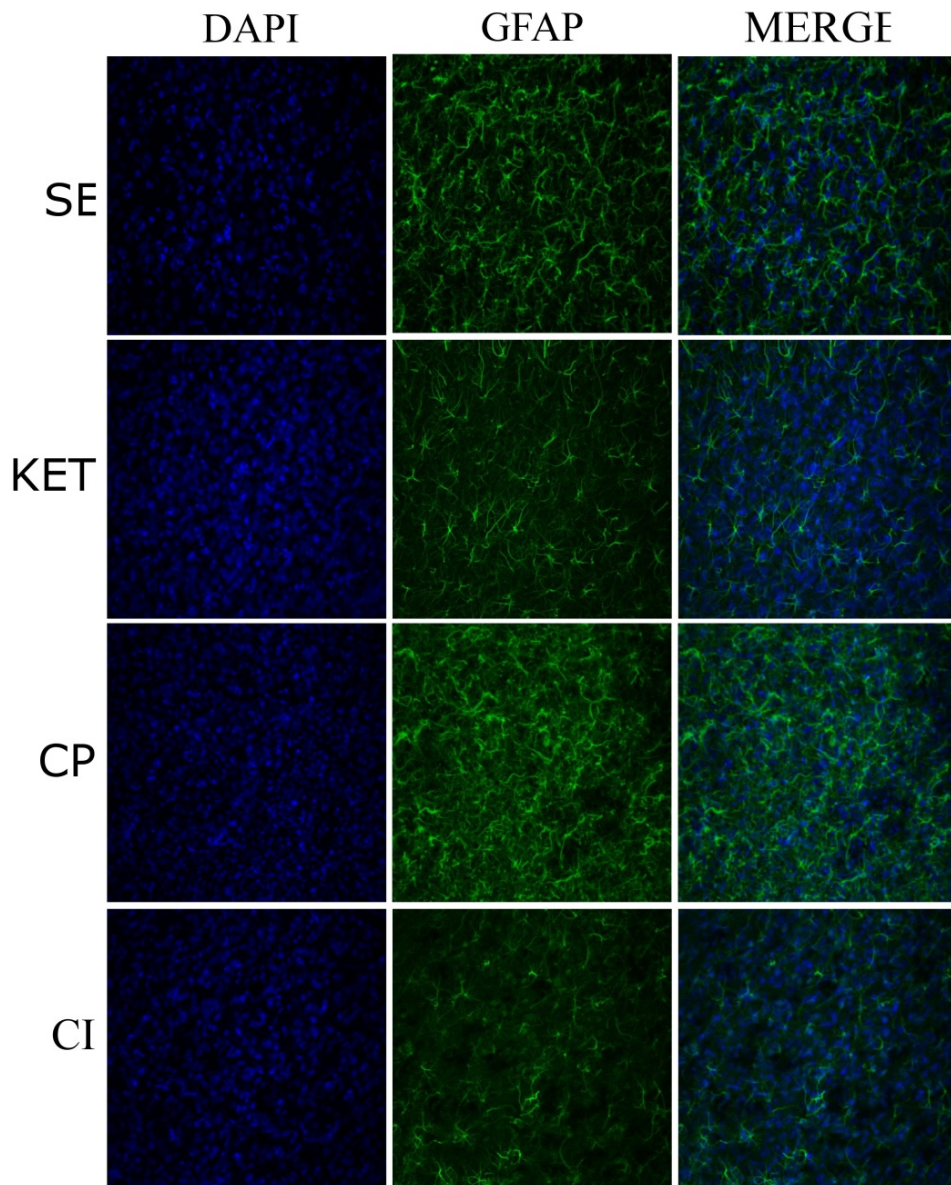












3. CONCLUSÃO

Nesse estudo, investigou-se a eficácia de antagonistas específicos de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B (GluN2B) em prevenir morte neuronal e alterações comportamentais causadas pela crise epiléptica do tipo *status epilepticus*. Foi observada uma expressiva perda neuronal na região CA1 do hipocampo, MePV da amígdala e VM (núcleo ventromedial) e VPM (núcleo ventroposteromedial) do tálamo, 7 dias após a indução do *status epilepticus*. O efeito da administração da cetamina obtido em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa foi confirmado, uma vez que as crises epiléticas foram atenuadas e a morte neuronal foi prevenida. Ao contrário da cetamina, as drogas CP-101 606 or CI-1041 (antagonistas específicos de NMDAR contendo a subunidade GluN2B) não foram capazes de parar as crises convulsivas. No entanto, a morte neuronal na amígdala, hipocampo e tálamo foi prevenida com a administração de CI-1041. Esse resultado fornece uma importante informação sobre o mecanismo de morte neuronal no *status epilepticus*, já que ele demonstra que a subunidade GluN2B do NMDAR está envolvida na morte neuronal via NMDAR, e que essa neurodegeneração pode ser prevenida pelo antagonismo dessa subunidade específica de NMDAR. CP-101 606, por outro lado, não foi capaz de prevenir a morte neuronal nas regiões analisadas, o que pode indicar uma diferença farmacológica e/ou cinética desses antagonistas de receptores NMDA. Nesse estudo, também se investigou o efeito do tratamento com CP-101 606 e CI-1041 sobre a atividade da microglia e dos astrócitos. A administração de LiCl-pilocarpina levou a um aumento expressivo na ativação da microglia e astrogliose em todas as regiões cerebrais analisadas 7 dias após a indução do SE. Animais que receberam CP-101 606 como tratamento também apresentaram um aumento na ativação da microglia e astrogliose, o que indica a presença de um intenso processo inflamatório nessas áreas. Por outro lado, tratamento com cetamina ou CI-1041 preveniu esse processo inflamatório, uma vez que ativação em excesso da micróglia e astrogliose não foram observados.

Levando em consideração o que foi constatado nesses experimentos, os resultados dessa pesquisa sugerem que a morte neuronal causada pela indução do *status epilepticus* em ratos jovens pode ocorrer através de receptores NMDA especificamente contendo a subunidade GluN2B, uma vez que antagonistas de receptores NMDA contendo essa subunidade foram capazes de prevenir a neurodegeneração, quando administrados após o início da crise epilética. No entanto, essa neuroproteção foi observada apenas em animais que receberam CI-1041 e não CP-101 606. Tendo como base o fato de que ambas drogas atuam sobre o mesmo receptor e sobre a mesma subunidade (subunidade GluN2B de

NMDAR), são necessários mais estudos a fim de que se identifiquem as possíveis causas para esse resultado. Além disso, nossos resultados também sugerem que um processo inflamatório intenso esteja associado à morte neuronal ocorrida nos animais do grupo SE+SAL e nos animais tratados com CP-101 606. No entanto, mais pesquisa sobre esses processos é necessária a fim de que se constate se a neurodegeneração observada causou o processo inflamatório ou se a astrogliose e ativação em excesso da microglia levou à morte neuronal.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Engel, J., Jr., *A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology*. *Epilepsia*, 2001. **42**(6): p. 796-803.
2. Melo, A.N., Nunes, M. L., et al., *Crises epilépticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas* 2006, São Paulo.
3. Olney, J.W., *Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders*. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(1): p. 101-9.
4. de Oliveira, D.L., et al., *Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine*. *Brain Res*, 2004. **1018**(1): p. 48-54.
5. Walton, N.Y. and D.M. Treiman, *Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam*. *Exp Neurol*, 1988. **101**(2): p. 267-75.
6. Kapur, J. and R.L. Macdonald, *Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABA_A receptors*. *J Neurosci*, 1997. **17**(19): p. 7532-40.
7. Jones, D.M., et al., *Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus*. *Epilepsy Res*, 2002. **50**(3): p. 301-12.
8. Izquierdo, I. and J.H. Medina, *Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures*. *Neurobiol Learn Mem*, 1997. **68**(3): p. 285-316.
9. Segovia, G., et al., *Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective*. *Mech Ageing Dev*, 2001. **122**(1): p. 1-29.
10. Ozawa, S., H. Kamiya, and K. Tsuzuki, *Glutamate receptors in the mammalian central nervous system*. *Prog Neurobiol*, 1998. **54**(5): p. 581-618.
11. McDonald, J.W. and M.V. Johnston, *Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development*. *Brain Res Brain Res Rev*, 1990. **15**(1): p. 41-70.
12. Obrenovitch, T.P., et al., *Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox*. *Int J Dev Neurosci*, 2000. **18**(2-3): p. 281-7.
13. Carlson, H., et al., *Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy*. *Neurosci Lett*, 1992. **140**(1): p. 30-2.

14. During, M.J. and D.D. Spencer, *Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain*. Lancet, 1993. **341**(8861): p. 1607-10.
15. Lipton, S.A. and P.A. Rosenberg, *Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders*. N Engl J Med, 1994. **330**(9): p. 613-22.
16. Meldrum, B.S., *The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders*. Neurology, 1994. **44**(11 Suppl 8): p. S14-23.
17. Bradford, H.F., *Glutamate, GABA and epilepsy*. Prog Neurobiol, 1995. **47**(6): p. 477-511.
18. Price, D.L., *New order from neurological disorders*. Nature, 1999. **399**(6738 Suppl): p. A3-5.
19. Chapman, A.G., *Glutamate and epilepsy*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1043S-5S.
20. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1007S-15S.
21. Maragakis, N.J. and J.D. Rothstein, *Glutamate transporters in neurologic disease*. Arch Neurol, 2001. **58**(3): p. 365-70.
22. Meldrum, B.S., M.T. Akbar, and A.G. Chapman, *Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy*. Epilepsy Res, 1999. **36**(2-3): p. 189-204.
23. Goudet, C., et al., *Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain*. Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 43-56.
24. Petralia, R.S., *Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 267120.
25. Paoletti, P., *Molecular basis of NMDA receptor functional diversity*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(8): p. 1351-65.
26. Monaghan, D.T. and C.W. Cotman, *Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain*. J Neurosci, 1985. **5**(11): p. 2909-19.
27. Li, B., et al., *Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors*. Nat Neurosci, 2002. **5**(9): p. 833-4.
28. Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, and H. Bading, *Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways*. Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 405-14.