

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

CÁSSIO MORAIS LOSS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS
IONOTRÓPICOS DO TIPO NMDA NA MORTE NEURONAL E NAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO MODELO
EXPERIMENTAL DE *STATUS EPILEPTICUS* EM RATOS JOVENS**

Porto Alegre, fevereiro de 2013.

CÁSSIO MORAIS LOSS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS
IONOTRÓPICOS DO TIPO NMDA NA MORTE NEURONAL E NAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO MODELO
EXPERIMENTAL DE *STATUS EPILEPTICUS* EM RATOS JOVENS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas – Bioquímica.**

Orientador: Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 2013

“Porque as pessoas desafiam seus limites? Porque se arriscam... voluntariamente? Não é por algum prêmio, troféu ou medalha. É pela convicção de que apesar de tudo sempre vale a pena seguir em frente. Apesar de todas as dificuldades, não desistir jamais.”

Clayton Conservani

**Aos meus pais Jesus Ivonei e Marizete por todo
o carinho e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Jesus Ivonei Santos Loss por ser uma pessoa maravilhosa que sempre se esforçou para que eu tivesse uma boa educação e sempre me deu apoio tanto nos momentos bons quanto nos difíceis, e por ser um exemplo de caráter.

A minha mãe Marizete Vilella Morais Loss por toda a energia gasta na minha educação, por sempre me incentivar a estudar, por aceitar as escolhas que eu fiz e nunca se opor, e por entender que em alguns momentos tive que estar ausente para completar esta etapa.

A minha namorada Samara, por todo amor e carinho, por ser uma grande companheira, por sempre me apoiar nas minhas escolhas, me incentivar a continuar estudando, me ajudar nos momentos difíceis e estar presente nos bons momentos.

Aos meus irmãos Augusto, Nicole e Natália por todos os momentos de alegria e descontração que passamos juntos.

Ao meu orientador Diogo Losch de Oliveira por todo auxílio prestado.

Ao Sandro pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório, e por toda ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

As alunas de Iniciação Científica Chairini, Mariana, Milena, e Thainá por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais companheiros de laboratório, e amigos e professores de outros laboratórios pela amizade e por todos os momentos de descontração.

Ao meu primo Felipe que me permitiu ficar hospedado em sua casa em diversos momentos que precisei.

A todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram, e por todos os momentos compartilhados.

Ao pessoal do futebol, pelas históricas e sempre muito bem humoradas partidas de futebol e posterior cervejada no Bar do Moita.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela competência e profissionalismo.

A CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de cinco partes:

Parte I. Resumo, Abstract, Lista de Abreviaturas, Introdução e Objetivos;

Parte II. Os resultados que fazem parte desta Dissertação estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos, subdivididos em: Introdução, Resultados, Discussão, Procedimentos Experimentais e Referências Bibliográficas;

Parte III. Discussão e Conclusão Geral;

Parte IV. Perspectivas;

Parte V. Referências bibliográficas referentes à Parte I e Parte II.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
INTRODUÇÃO	5
1. GLUTAMATO	5
1.1 Neurotransmissão Glutamatérgica	5
1.1.1 Receptores Glutamatérgicos.....	6
1.2 Receptores NMDA.....	8
1.2.1 Estrutura e composição dos receptores NMDA	9
1.2.2 Expressão e localização dos receptores NMDA	10
1.2.3 Receptores NMDA e excitotoxicidade glutamatérgica.....	13
2. EPILEPSIAS	14
2.1. Epilepsia do lobo temporal.....	15
2.2. <i>Status Epilepticus</i>	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
PARTE II. RESULTADOS	19
CAPÍTULO I.....	20
CAPÍTULO II	29
PARTE III. DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO	57
PARTE IV. PERSPECTIVAS	59
PARTE V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO I	70

PARTE I

RESUMO

O *status epilepticus* (SE) é caracterizado por uma crise epiléptica com duração maior que 30 minutos ou crises sucessivas nas quais os níveis de consciência do paciente não são recuperados entre elas. O SE, quando ocorrido durante a infância, pode induzir morte neuronal e levar a alterações comportamentais e cognitivas na idade adulta. O dano cerebral induzido pelo SE têm sido frequentemente relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica, principalmente através da hiperestimulação de receptores do tipo NMDA (NMDAR), levando a um excessivo influxo de íons Ca^{+2} no neurônio, podendo causar morte celular. No presente estudo, investigamos os efeitos de antagonistas de NMDAR sobre a morte neuronal e as alterações comportamentais em animais submetidos ao modelo de SE induzido por LiCl-pilocarpina durante períodos iniciais do desenvolvimento cerebral. Ratos Wistar de 16 dias de vida (P16) receberam uma injeção de pilocarpina (60 mg/kg i.p.) 12-18 h após terem recebido LiCl (3 mEq/kg i.p.). Animais controle receberam salina 0,9%. Na primeira parte deste trabalho, nós investigamos o efeito do antagonista não competitivo e não seletivo de NMDAR, cetamina, administrado após o início das crises, sobre a morte neuronal e as alterações comportamentais induzidas pelo SE. Neste trabalho, observou-se que o SE induzido no início da vida leva a uma expressiva perda neuronal na região CA1 do hipocampo, na habenula, na amígdala e no tálamo 24 após a convulsão. O tratamento com cetamina foi capaz de interromper as convulsões, prevenindo, também, a neurodegeneração. Além disso, o SE induzido em P16 causou aumento nos níveis de ansiedade durante o período adulto, e a intervenção com cetamina foi capaz de reduzir o efeito ansiogênico do SE. Além disso, observou-se um efeito ansiogênico da administração de cetamina *per se* em animais que não foram submetidos ao SE. Na segunda parte deste estudo, após identificar que o bloqueio de NMDAR é capaz de prevenir os danos a curto e longo prazo induzidos pelo SE, investigamos qual o papel dos NMDAR contendo a subunidade GluN2B na neurodegeneração induzida pelo SE. Neste trabalho, observamos que, diferentemente do bloqueio dos NMDAR através do uso da cetamina, a administração dos antagonistas específicos de NMDAR contendo a subunidade GluN2B, CP-101606 (taxoprodil) e CI-1041 (besonprodil), não foi capaz de terminar as crises convulsivas do SE. No entanto foi eficaz na redução da mortalidade em comparação com os animais SE. Observou-se ainda que diferentemente da cetamina, o bloqueio de NMDAR contendo a subunidade GluN2B não foi capaz de reverter totalmente o dano cerebral induzido pelo SE. Animais que sofreram SE e receberam CI-1041 durante as convulsões apresentaram uma redução na neurodegeneração somente em algumas regiões como hipocampo e amígdala, indicando um efeito neuroprotetor deste composto. No entanto, animais que receberam CP-101606 durante o SE não apresentaram redução na degeneração neuronal nas regiões analisadas. Nossos resultados sugerem, portanto, que o sistema glutamatérgico é um alvo em potencial para o tratamento da neurodegeneração induzida por crises epilépticas prologadas, e que o antagonismo de NMDAR pode servir, pelo menos, como terapia farmacológica complementar em pacientes que sofrem SE durante a infância. Além disso, nossos dados sugerem existir o envolvimento de outras subunidades do NMDAR, além da GluN2B, no dano neuronal induzido pelo SE.

ABSTRACT

Status epilepticus (SE) is characterized as a prolonged seizure activity or repeated seizures lasting more than 30 min. For immature brains, SE is associated with cellular and behavioral alterations such as neuronal loss and behavioral impairment during adulthood. Brain damage induced by SE has frequently been related to glutamatergic excitotoxicity, mainly through NMDA receptors overstimulation (NMDAR), which can lead to neurodegeneration. In the present study, we investigated the effects of NMDAR antagonists on short- (neuronal death) and long-term (behavioral changes) alterations in animals subjected to SE early in life. Rat pups were injected with LiCl (3 mEq/kg i.p.) 12-18 h prior to pilocarpine (60 mg/kg i.p. - SE group) or saline (0.9%) administration on 16th postnatal day (P16). In the first part of this study, we administered the noncompetitive and non-selective NMDAR antagonist, ketamine, after SE onset to investigate the effect NMDAR blocking on neuronal death and behavioral changes induced SE. We observed that SE induced caused a significant neuronal loss in the CA1 region of the hippocampus, habenula, amygdala and thalamus 24 h after seizures. Treatment with ketamine was able to terminate seizures and to prevent neurodegeneration induced by SE. Moreover, young animal treated with LiCl-pilocarpine presented elevated levels of anxiety at adulthood. Treatment with ketamine prevented this ansiogenic effect of SE. In addition, administration of ketamine alone also induced an increase in anxiety levels in adulthood. In the second part of the study, we investigate the role of NMDAR-containing GluN2B subunit in the neurodegeneration induced by early-life SE. In this work, we found that blocking of NMDAR containing the GluN2B subunit by the compounds CP-101606 (taxoprodil) and CI-1041 (besonprodil) was unable to terminate seizures induced by SE, in contrast to that observed for ketamine treatment. However, treatment with antagonists of NMDAR-containing GluN2B subunit was effective in reducing mortality as compared to SE animals. CP-101606 and CI-1041 treatment were not able to completely reverse the brain damage induced by SE. Animals that were underwent SE and received CI-1041 during seizures presented a reduction in neurodegeneration in some regions such as the hippocampus and amygdala. However, animals that received CP-101606 during SE did not present a reduction in neuronal degeneration in all regions analyzed. Our results therefore suggest that glutamatergic system is a potential target for the treatment of SE, and that antagonism of NMDAR could be used at least as a complementary pharmacotherapy in patients suffering SE during childhood. Furthermore, our data suggest that there is involvement of other NMDAR subunits, beyond GluN2B, in neuronal damage induced by SE.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ELT	epilepsia do lobo temporal
GABA	ácido gama-aminobutírico
GD	giro denteado do hipocampo
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GluRs	receptores glutamatérgicos
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
iGluRs	receptores glutamatérgicos ionotrópicos
mGluRs	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mRNA	RNA mensageiro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	receptor N-metil-D-aspartato
PEPSs	potenciais excitatórios pós-sinápticos
SE	<i>status epilepticus</i>
SNC	sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1. GLUTAMATO

A comunicação entre os neurônios no cérebro é à base da aprendizagem, da memória e de todas as ações e decisões tomadas por um organismo. Ela envolve a secreção de neurotransmissores a partir de um neurônio pré-sináptico, o qual ativa um receptor associado a um neurônio pós-sináptico, causando uma resposta de excitação ou inibição deste último. O mais importante e mais bem estudado destes neurotransmissores é o aminoácido excitatório glutamato (Petralia 2012).

1.1 Neurotransmissão Glutamatérgica

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, onde participa de inúmeros eventos fisiológicos e plásticos tais como: memória e aprendizado (Izquierdo e Medina 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia *et al.* 2001), adaptação ambiental (Ozawa, Kamiya e Tsuzuki 1998), proliferação e migração celular (McDonald e Johnston 1990).

Este aminoácido é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir principalmente da glutamina, pela ação da glutaminase (Schousboe *et al.* 1997) e estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100 mM (Nedergaard, Takano e Hansen 2002). A partir de 1970, inúmeros estudos demonstraram que o glutamato é: 1) estocado na pré-sinapse em neurônios específicos, 2) liberado por estímulos fisiológicos em concentrações suficientes para gerar uma resposta pós-sináptica, 3) apresenta identidade de ação com neurotransmissores naturais, incluindo resposta a antagonistas, 4) e está sujeito a mecanismos que terminam a ação excitatória no neurônio pós-sináptico. Somente após estes fatos é que ele foi reconhecido como neurotransmissor (Fonnum 1984).

O glutamato possui uma baixa permeabilidade na barreira hematoencefálica. Portanto, praticamente todo o glutamato presente no cérebro é sintetizado a partir da transaminação do α -cetoglutarato e/ou glutamina tanto em neurônios como na glia. Nas células gliais o glutamato é convertido à glutamina através da enzima glutamina sintetase e, então, é liberado no meio extracelular. A glutamina é captada pelos neurônios e convertida a glutamato antes de ser armazenado nas vesículas pré-sinápticas (Figura 1). A glutamina serve também como transportador do excesso de amônia, sendo transportada através da barreira hematoencefálica e liberada na corrente sanguínea (Nedergaard, Takano e Hansen 2002).

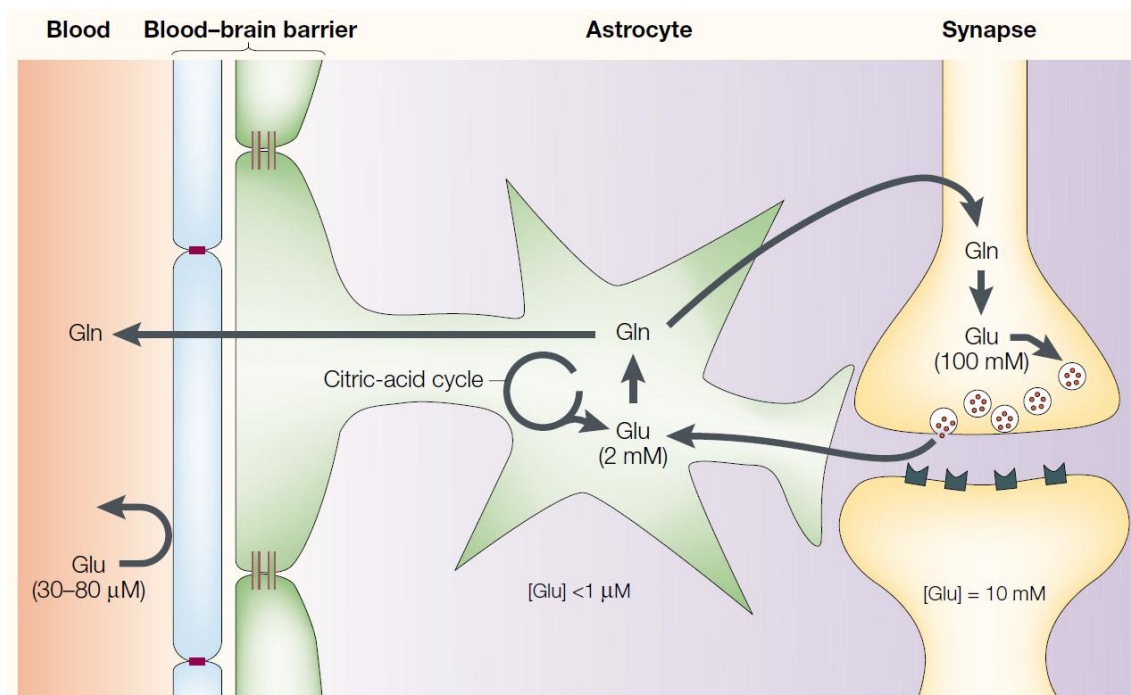


Figura 1- Esquema geral do metabolismo do glutamato no SNC. Legenda: Glutamato (Glu), glutamina (Gln). Fonte: Nedergaard et al. (2002).

1.1.1 Receptores Glutamatérgicos

Cada neurotransmissor exerce seus efeitos pós-sinápticos através da ligação a receptores específicos. Via de regra, dois neurotransmissores diferentes não se ligam a um mesmo receptor, contudo, um único neurotransmissor pode-se ligar a vários tipos diferentes de receptores (Bear, Connors e Paradiso 2002). As diversas ações do

glutamato, tanto fisiológicas quanto patológicas, resultam de sua ação sobre receptores de membrana, tanto neuronais como gliais (Ozawa, Kamiya e Tsuzuki 1998), os quais são divididos em duas classes: metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs) (Tanabe *et al.* 1992; Bear, Connors e Paradiso 2002).

Os receptores metabotrópicos estão acoplados ao mecanismo de transdução de sinal via proteínas G modulando a produção intracelular de segundos mensageiros (Ozawa, Kamiya e Tsuzuki 1998). Sabe-se que a transmissão nesses receptores envolve três etapas: 1) ligação do neurotransmissor a proteína receptora, 2) ativação e/ou inativação da proteína G e 3) ativação e/ou inativação de sistemas efetores (Bear, Connors e Paradiso 2002). Atualmente, uma família de 8 subtipos de receptores (mGluR1-8) subdividida em três grupos (mGluRs I, II e III), esta descrita (Ozawa, Kamiya e Tsuzuki 1998).

Já os receptores ionotrópicos, os quais são funcional e farmacologicamente distintos dos mGluRs, são responsáveis pela iniciação, propagação e ampliação do sinal glutamatérgico (Cotman, Monaghan e Ganong 1988). Os iGluRs contêm um canal iônico cátion-específico e são subdivididos em três subtipos: cainato, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Estes receptores, quando estimulados, permitem a passagem de íons através de seu canal, induzindo um potencial de ação no neurônio pós-sináptico. Os iGluRs dos tipos AMPA e NMDA medeiam a maior parte da transmissão sináptica rápida no encéfalo. Os receptores de cainato também existem em todo o encéfalo, mas suas funções ainda não totalmente conhecidas (Bear, Connors e Paradiso 2002).

Tanto canais AMPA quanto cainato são permeáveis aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+), mas a maioria deles é impermeável ao íon cálcio (Ca^{+2}) (Cotman, Monaghan e Ganong 1988; Bear, Connors e Paradiso 2002). Ambos estão distribuídos

amplamente no SNC, entretanto, a expressão de suas subunidades é muito heterogênea entre as diferentes estruturas e tipos celulares (Ozawa, Kamiya e Tsuzuki 1998). O efeito líquido da sua ativação, em potenciais de membrana negativos normais, é permitir a entrada de íons Na^+ na célula, causando uma despolarização rápida e intensa. Os receptores AMPA coexistem com receptores NMDA (NMDAR) em muitas sinapses no encéfalo, de forma que muitos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPSs) mediados por glutamato possuem componentes formados por ambos. Os receptores cainato estão mais concentrados em poucas áreas do SNC: região CA3 do hipocampo, estriado e tálamo (Cotman, Monaghan e Ganong 1988).

Os NMDAR são dependentes de voltagem, e diferentemente dos receptores AMPA e cainato, são altamente permeáveis a Ca^{+2} e possuem como co-agonistas glicina e D-serina (Johnson e Ascher 1987; Kemp e Leeson 1993; Schell, Molliver e Snyder 1995; Mothet *et al.* 2000; Henneberger *et al.* 2013). Estes receptores parecem ter um papel central em eventos de plasticidade sináptica, tais como na potenciação de longa duração e na depressão de longa duração. Além disso, quando superativados podem levar a um evento patofisiológico denominado de excitotoxicidade neurodegenerativa (Nicoletti *et al.* 1996).

1.2 Receptores NMDA

Os NMDAR são mediadores importantes da plasticidade neuronal, ou seja, participam de eventos que acarretam mudança na estrutura e função celular, resultante do influxo de Ca^{+2} no neurônio através do canal formado pelas subunidades destes receptores. O Ca^{+2} intracelular proveniente da abertura do canal dos NMDAR funciona como um segundo mensageiro e ativa mecanismos específicos da célula, os quais estão relacionados com a mudança de função do neurônio (Petralia 2012).

Além disso, conforme citado anteriormente, o glutamato quando presente em altas concentrações na fenda sináptica por um longo período pode tornar-se uma potente neurotoxina (Olney 1969). Sua ação neurotóxica se dá principalmente pela hiperestimulação dos NMDAR, levando a um excessivo influxo de Ca^{+2} no neurônio, evento o qual é capaz de promover a morte da célula.

1.2.1 Estrutura e composição dos receptores NMDA

Os NMDAR, assim como outros iGluRs, são complexos heterotetraméricos formados por quatro subunidades que em conjunto formam um canal para a passagem de íons. Até o presente momento foram identificadas 3 famílias de subunidades dos NMDAR: GluN1, GluN2 e, mais recentemente, GluN3 (de acordo com a nomenclatura antiga, NR1, NR2 e NR3, respectivamente – Tabela 1) (Paoletti 2011). Tipicamente os NMDAR são formados por duas subunidades GluN1, dos quais existem oito variantes (GluN1 1a-4a; 1b-4b) gerados por processamento (*splicing*) alternativo do RNA mensageiro (mRNA) de um único gene (Dingledine *et al.* 1999; Watkins e Jane 2006), e duas subunidades GluN2, dos quais existem quatro tipos (GluN2A-D) (Figura 2). Menos comumente, os NMDARs podem conter subunidades GluN3 (GluN3A-B). Desta forma, podem existir como tetrâmeros formados como GluN1/GluN2, GluN1/GluN2/GluN3 ou GluN1/GluN3 (Henson *et al.* 2010; Paoletti 2011).

Tabela 1- Composição dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos. * indica nomenclatura antiga. Adaptado de Spooren *et al.* (2003).

Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos					
NMDA		AMPA		Cainato	
subunidades	GluN1 (1a-4a; 1b-4b)	NR1 (a-h) *	GLUR1	GLUK1	KA-1 *
	GluN2 (A-D)	NR2 (A-D)	GLUR2	GLUK2	KA-2 *
	GluN3 (A-B)	NR3 (A-B)	GLUR3	GLUK5	GLUR5 *
			GLUR4	GLUK6	GLUR6 *
				GLUK7	GLUR7 *

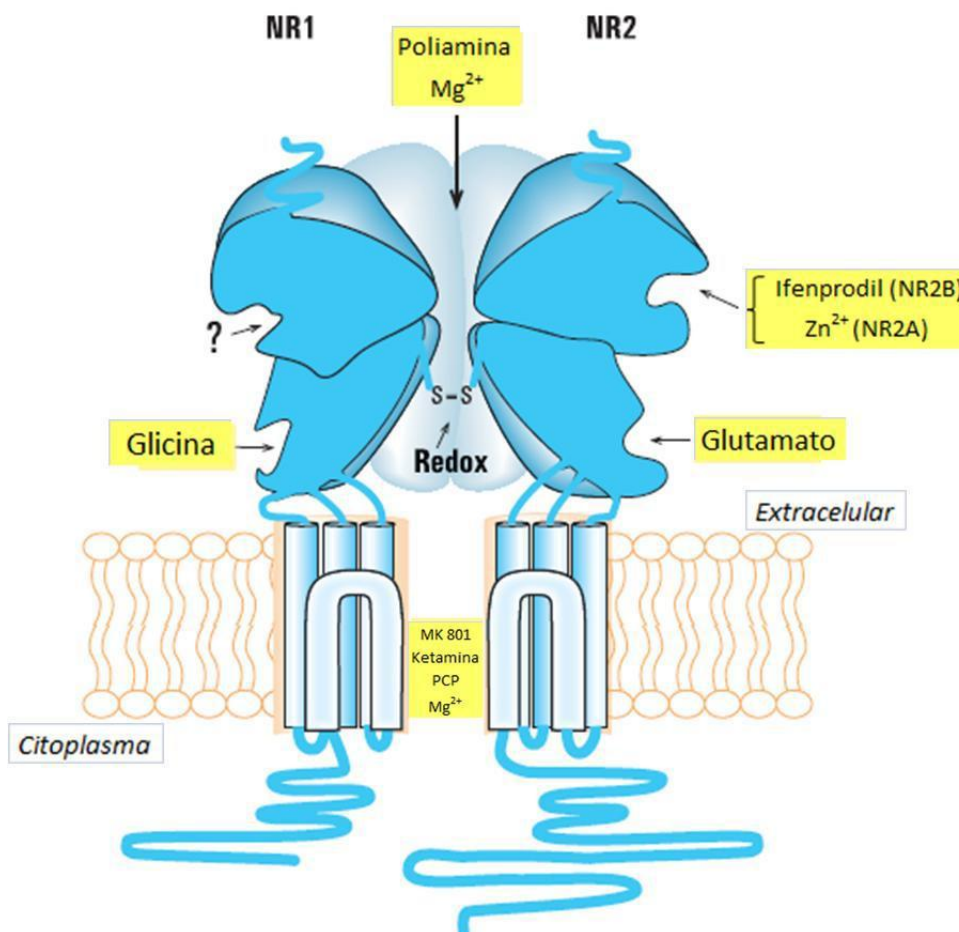


Figura 2- Estrutura do receptor NMDA. Fonte: Adaptado de Kemp e McKernan (2002).

Os NMDARs contêm vários sítios de ligação para antagonistas modulatórios que podem servir como alvos para farmacoterapias: sítios de ligação do glutamato, sítios de ligação do co-agonista glicina, sítios dentro do receptor ionóforo, e sítios para moduladores alostéricos (Bigge 1993). A presença destes sítios irá depender da composição e arranjo das subunidades, e, portanto, a diversidade da expressão das subunidades em várias combinações confere aos diferentes tipos de NMDAR funções e propriedades farmacológicas distintas (Chatterton *et al.* 2002; Prybylowski e Wenthold 2004). Um NMDAR funcional, responsivo ao glutamato e à glicina, necessariamente requer a presença de, pelo menos, uma subunidade GluN1 e uma subunidade GluN2 (Monaghan e Jane 2009), uma vez que o glutamato liga-se a subunidades GluN2, enquanto glicina ou D-serina ligam-se a subunidades GluN1 e GluN3 (Henson *et al.*

2010). Mesmo os NMDAR formados como GluN1/GluN2 podem apresentar diferenças entre si, tais como farmacocinética, condutância e permeabilidade a íons diferenciada, uma vez que a existência de um grande repertório de subunidades para o NMDAR permite várias combinações de montagem dando origem a uma multiplicidade de receptores funcionalmente distintos (Ogden e Traynelis 2011; Paoletti 2011). Receptores compostos pelas subunidades GluN2A ou GluN2B exibem alta condutâncias e elevada sensibilidade ao bloqueio por Mg^{+2} enquanto que os NMDARs que contêm subunidades GluN2C ou GluN2D apresentam condutâncias menores e uma menor sensibilidade para Mg^{+2} (Paoletti 2011). Além disso, sendo a subunidade GluN2 responsável pela modulação do influxo de íons ativada pelo glutamato, NMDAR formados como GluN1/GluN2/GluN3 exibem baixa condutância de Ca^{+2} e permeabilidade reduzida, e NMDAR formados como GluN1/GluN3 não são responsivos ao glutamato (Henson *et al.* 2010).

NMDAR são proteínas integrais de membrana que incorporam quatro grandes subunidades formando um poro no centro do canal iônico, o qual apresenta permeabilidade altamente seletiva para os cátions Na^{+} , K^{+} e Ca^{+2} (Paoletti 2011). Este canal iônico é formado por um domínio de membrana composto de três segmentos transmembranares (M1, M3 e M4), além de um alça reentrante curta (*P loop* ou M2) (Figura 2) (Paoletti 2011). Durante o potencial de repouso, os canais acoplados ao NMDAR estão normalmente bloqueados por íons Mg^{+2} (Riedel, Platt e Micheau 2003), o que impede a passagem de outros íons. Para que o Mg^{+2} desobstrua o poro e ocorra a ativação do NMDAR, é necessário ocorrer a despolarização da membrana neuronal. Quando a membrana está despolarizada, o Mg^{+2} sai do poro, o que normalmente segue a ação do glutamato causando ativação de canais AMPA na mesma sinapse ou em sinapses vizinhas (Bear, Connors e Paradiso 2002). Por este motivo, a entrada de íons

através do canal do NMDAR é considerada dependente de voltagem, uma vez que depende tanto do glutamato, para ativação de NMDAR, quanto da despolarização da membrana, para desobstrução do canal pelo Mg^{+2} (Bear, Connors e Paradiso 2009).

1.2.2 Expressão e localização dos receptores NMDA

Os NMDAR são amplamente distribuídos no SNC, sendo sua expressão máxima na região CA1 do hipocampo (Monaghan e Cotman 1985). No encéfalo maduro, a expressão dos mRNA das subunidades GluN2A-D varia de acordo com a estrutura do SNC. As subunidades GluN2A e GluN2B são as predominantemente encontradas no córtex cerebral e no hipocampo (Monyer *et al.* 1994; Sheng *et al.* 1994; Cull-Candy, Brickley e Farrant 2001) e sofrem alterações em sua expressão durante os diferentes estágios do desenvolvimento cerebral (Figura 3). Durante estágios iniciais do desenvolvimento cerebral as conexões sinápticas ainda não estão bem estabelecidas e, portanto, os NMDAR são predominantemente não sinápticos. Nesta etapa do desenvolvimento, neurônios corticais e hipocámpais expressam principalmente a subunidade GluN2B enquanto que a subunidade GluN2A começa a ser expressa mais tardiamente, aumenta sua expressão ao longo do desenvolvimento (Figura 3) (Li *et al.* 2002).

Trabalhos tem sugerido que em sinapses maduras, a subunidade GluN2A é expressa principalmente no botão sináptico (NMDAR sinápticos) enquanto que a subunidade GluN2B é expressa na extra-sinapse (NMDARs extrasinápticos) (Petralia 2012). Além disso, estudos tem sugerido que as diferentes localizações dos NMDARs refletem diferentes funções destes receptores, as quais são influenciadas não somente pelo local onde se encontram (compartimentalização), mas também pelas subunidades que os compõem (Hardingham, Fukunaga e Bading 2002; Li *et al.* 2002; Petralia 2012).

Estas diferentes funções dos NMDAR tem sido relatada estar envolvida tanto nos processos fisiológicos quanto nos processos patológicos do SNC.

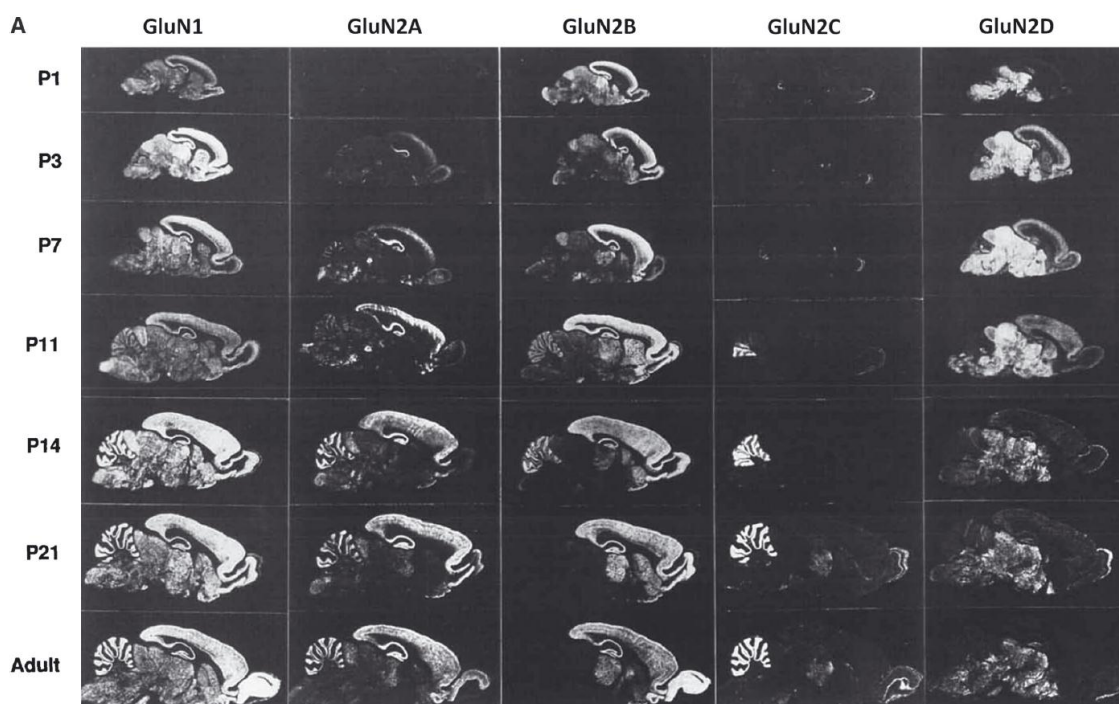


Figura 3- Distribuição do mRNA de subunidades NMDAR no cérebro de rato. Cortes sagitais de hibridizações *in situ* mostram as alterações no desenvolvimento pós-natal da expressão de mRNA de GluN1 e GluN2A-D. Fonte: Akazawa *et al.* (1994).

1.2.3 Receptores NMDA e excitotoxicidade glutamatérgica

A modulação da neurotransmissão mediada por receptores excitatórios glutamatérgicos, principalmente do tipo NMDA, é conhecida por ter importantes implicações para a origem da lesão e morte celular. Isto é observado numa variedade de condições diferentes, incluindo acidente vascular cerebral, hipóxia, isquemia, epilepsia entre outras (Flores-Soto *et al.* 2012). Estas condições compartilham características patológicas comuns, incluindo perda neuronal gradual e seletiva, principalmente devido à hiperatividade de NMDAR. Embora os grupos neuronais afetados variem de acordo com a doença, e as causas da morte neuronal sejam desconhecidas, a hiperestimulação dos NMDAR geralmente conduz a um aumento na concentração de Ca^{+2} no citoplasma e a geração de espécies reativas de oxigênio (Di Maio *et al.* 2011; Flores-Soto *et al.*

2012) levando a oxidação lipídica, proteica e de DNA. Esses fatores parecem desempenhar um papel muito importante na neurodegeneração em patologias tais como as epilepsias.

2. EPILEPSIAS

A epilepsia é uma condição médica que afeta de 1 a 2 % da população mundial, definindo-se como distúrbio crônico do SNC e tendo como característica principal a manifestação de crises epiléticas recorrentes e espontâneas (Engel 2001b; Melo, Nunes e Yacubian 2006).

Uma crise epilética é o resultado de uma descarga elétrica excessiva, anormal e geralmente rápida de um grupo de neurônios que pode estar localizado em qualquer uma das regiões cerebrais. As manifestações clínicas destas crises dependerão não só da região onde a descarga se localiza como também de sua possível propagação para áreas cerebrais vizinhas. Suas causas podem ser algumas vezes identificadas, incluindo tumores, trauma, disfunção metabólica, infecção e doença vascular, porém, em muitos casos, as causas destas crises são desconhecidas (Bear, Connors e Paradiso 2002; Melo, Nunes e Yacubian 2006). Além disso, esta patologia tende a durar por toda a vida, sendo que os danos causados ao organismo podem ser irreversíveis, tais como morte neuronal, alterações comportamentais, prejuízos na memória e aprendizado, entre outros (de Oliveira *et al.* 2004). Desta forma, a importância médica das epilepsias, acentua-se ainda mais, pois tais problemas podem acarretar profundas consequências psicopatológicas e sociais (de Oliveira *et al.* 2004).

Apesar de crises epiléticas isoladas ocorrerem com uma frequência moderada sendo que 7 a 10 % da população em geral tem ao menos uma crise durante a vida, um paciente somente será considerado epilético quando apresentar crises epiléticas repetidas (Berne e Levy 2000).

2.1. Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a condição epiléptica de maior prevalência na idade adulta (Elger e Schmidt 2008). Além disso, cerca de 30% dos pacientes portadores de ELT são refratários ao tratamento farmacológico disponível atualmente, mesmo quando utilizada uma combinação de 2 ou mais anticonvulsivantes. Nestes casos, a remoção cirúrgica da área epileptogênica (lobotomia) é a única alternativa para remissão e/ou controle das crises, sendo que cerca de 20% dos pacientes continuam apresentando crises (Engel 2001a).

A esclerose hipocampal é uma característica frequente nos pacientes portadores de ELT (presente em cerca de 50% a 70% dos pacientes) (Engel, Williamson e Wieser 1997). A esclerose hipocampal induz perda neuronal progressiva e gliose reativa nas regiões CA1 e hilo do hipocampo. No entanto, não alteram a anatomia e morfologia das regiões CA2, giro dentado e subículum (McNamara 1994). Embora exista uma grande correlação entre esclerose hipocampal e ELT, pouco se sabe sobre como a esclerose hipocampal influencia na geração de crises convulsivas, sendo que este tema continua gerando grande debate. Alguns estudos observaram que danos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento cerebral podem levar a esclerose hipocampal, que por sua vez, pode estar relacionada ao desenvolvimento de ELT (Meyer, Falconer e Beck 1954). Dentre estas injúrias que podem levar ao desenvolvimento de ELT, podemos citar as convulsões febris e as crises epilépticas prolongadas (*status epilepticus* – SE) que estão entre as mais frequentes (Mathern *et al.* 2002). Estudos prévios observaram que aproximadamente 80% dos pacientes com ELT apresentaram, durante os primeiros anos de vida, convulsões febris ou SE (Mathern, Pretorius e Babb 1995; VanLandingham *et al.* 1998).

2.2. Status Epilepticus

O SE, também chamado de “estado de mal epiléptico” é classificado como uma crise que dura mais de 30 minutos, ou crises sucessivas nas quais os níveis de consciência do paciente não sejam recuperados entre elas (Melo, Nunes e Yacubian 2006). Embora essa definição seja geralmente aceita, alguns pesquisadores consideram que crises contínuas com duração inferior a 30 minutos já seja caracterizado como SE, pois na prática, qualquer pessoa que apresente atividade convulsiva contínua sem recuperar a consciência em um período de tempo igual ou superior a 5 minutos, irá desenvolver o SE (Sirven e Waterhouse 2003). Este tipo de crise epiléptica exige atenção especial, pois além de freqüente, tem mortalidade de até 11% e morbidade em torno de 50% (Aicardi e Chevrie 1970; Aicardi e Chevrie 1989).

O SE generalizado está associado a graves alterações fisiológicas sistêmicas resultantes das demandas metabólicas de crises epilépticas duradouras. Muitas destas alterações sistêmicas (tais como hipóxia, hipoglicemia, acidose metabólica, e outros distúrbios eletrolíticos) requerem intervenção médica e podem levar o indivíduo a óbito se não tratadas (Sirven e Waterhouse 2003).

O impacto de crises epilépticas prolongadas sob a maturação do SNC não estão totalmente esclarecidas e constituem um importante alvo de investigação (Sankar e Rho 2007). Indivíduos acometidos de SE durante a infância podem apresentar, na idade adulta, alterações no comportamento emocional, esclerose hipocampal, déficit cognitivo e epilepsia secundária (van Esch *et al.* 1996). Alguns estudos indicam uma redução do volume hipocampal, amigdalal e do córtex perirrinal em ratos que foram induzidos ao SE aos 12 dias (Nairismagi *et al.* 2006). Além disso, experimentos em ratos mostraram que animais expostos a atividade convulsiva durante duas horas apresentaram morte neuronal no núcleo mediodorsal do tálamo (Kubova *et al.* 2001), assim como animais induzidos ao SE por LiCl-pilocarpina apresentaram morte neuronal nas regiões CA1 e giro denteado (GD) do hipocampo (de Oliveira *et al.* 2008). Além disso, a morte

neuronal pode estar relacionada com o brotamento de fibras musgosas nas regiões CA3 e GD do hipocampo, e estas, por sua vez, podem levar a alterações comportamentais na idade adulta, como déficits de memória e aprendizado, aumento na ansiedade e alterações na atividade exploratória (Hoffmann, Zhao e Holmes 2004; Sayin, Sutula e Stafstrom 2004; de Oliveira *et al.* 2008).

Inúmeros trabalhos, utilizando tecido cerebral de pacientes com ELT e modelos animais, têm sido realizados no intuito de elucidar as bases fisiológicas e neuroquímicas envolvidas nas alterações cerebrais decorrentes de crises epilépticas de longa duração. Entre os modelos mais bem caracterizados estão o modelo de abrasamento (ou *kindling*) e o modelo da pilocarpina (Turski *et al.* 1983). O modelo de SE induzido por pilocarpina é caracterizado pela administração aguda de uma alta dose deste agonista colinérgico. Inicialmente, a atividade epiléptica se deve a ação estimulatória da pilocarpina sobre o sistema colinérgico, enquanto a manutenção da crise se deve a ativação do sistema glutamatérgico (McDonough e Shih 1997). Clifford *et al.* (1987) demonstraram que um pré-tratamento com cloreto de lítio potencializa a ação epileptogênica da pilocarpina, possibilitando uma redução na dose administrada, o que diminui consideravelmente os efeitos colinérgicos periféricos e conseqüentemente a mortalidade, sem alterar, no entanto, o padrão convulsivo. Um estudo recente utilizando ratos adultos demonstrou que pelo menos até o 14º dia pós-SE, é observada uma massiva neurodegeneração em diversas áreas cerebrais (Wang *et al.* 2008), as quais podem ter relação com as alterações a longo prazo observadas após o SE. É sabido que, após o SE os animais iniciam um período onde há a ausência de alterações eletroencefalográficas bem como de crises recorrentes, denominado fase latente. Após este período, aproximadamente 80% dos animais começam a apresentar crises espontâneas de origem límbica acompanhadas de anormalidades comportamentais (Leite, Garcia-Cairasco e Cavalheiro 2002; Curia *et al.* 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA sobre as alterações a curto e longo prazo induzidas pelo *status epilepticus* em ratos jovens.

3.2. Objetivos específicos

Investigar o efeito do tratamento com cetamina durante o SE sobre a morte neuronal induzida pelo SE em ratos de 16 dias.

Avaliar o efeito do tratamento com cetamina durante o SE sobre as alterações comportamentais de longa duração induzidas pelo SE em ratos de 16 dias.

Investigar o efeito do bloqueio de NMDAR contendo a subunidade GluN2B após o início do SE sobre a morte neuronal induzida por LiCl-pilocarpina em ratos de 16 dias.

PARTE II. RESULTADOS

CAPÍTULO I**KETAMINE REDUCES NEURONAL DEGENERATION AND ANXIETY
LEVELS WHEN ADMINISTERED DURING EARLY LIFE-INDUCED STATUS
EPILEPTICUS IN RATS.**

Cássio M. Loss*, Sandro D. Córdova e Diogo L. de Oliveira.

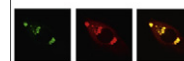
ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *BRAIN RESEARCH*

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats

Cássio Morais Loss*, Sandro Daniel Córdova, Diogo Losch de Oliveira

Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 24 July 2012

Available online 3 August 2012

Keywords:

Epilepsy
Neuroprotection
Pilocarpine
Development
Neuronal death
Anxiety

ABSTRACT

Status epilepticus (SE) when occurred during brain development can cause short- and long-term consequences, which are frequently associated with NMDA-mediated glutamatergic excitotoxicity. In the present work, we investigated the putative neuroprotective role of ketamine, an NMDA receptor antagonist, on early life SE-induced acute neuronal death and long-term behavioral abnormalities. Male Wistar rats (16 postnatal days) were induced to SE by LiCl-pilocarpine i.p. administration (3 mEq/kg; 60 mg/kg, respectively). Fifteen or 60 min after pilocarpine injection, animals received a ketamine administration (22.5 mg/kg i.p.). Neuronal degeneration was assessed 24 h after SE induction. Another subset of animals was destined to behavioral tasks in adulthood (75–80 postnatal days). Fluoro-Jade C labeling revealed a marked neuronal death on CA1 hippocampal subfield, habenula, thalamus and amygdala in SE animals. Ketamine post-SE onset treatment prevented neuronal death in all regions assessed. In the elevated plus maze, SE induced an increase in anxiety-like behaviors whereas ketamine administration during seizures was able to prevent this alteration. Ketamine administration in non-SE animals resulted in high anxiety levels. There were no observed differences among groups in the open field task in all parameters analyzed. Our results suggest that ketamine post-SE onset treatment was effective in preventing acute and long-standing alterations caused by SE early in life, which indicates a putative role of glutamatergic system on SE-induced brain damage as well as long-lasting behavioral consequences.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening neurological disorder defined as a seizure or repeated seizures lasting more than

30 min (Chen and Wasterlain, 2006) and its incidence is higher during infancy and childhood (Gross-Tsur and Shinnar, 1993; Holmes, 1997). Previous studies using animals models have reported that prolonged epileptic activity, when occurred during

Abbreviations: CTRL, control; EPM, elevated plus maze; FJC, Fluoro-Jade C; i.p., intraperitoneal; KET, ketamine treated group; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; PND, postnatal day; POm, posteromedial thalamic nucleus; SE, status epilepticus; SE+KET15, status epilepticus plus ketamine at 15 min; SE+KET60, status epilepticus plus ketamine at 60 min; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus

*Corresponding author at: Cássio Morais Loss, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo. CEP: 90035-003, Porto alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33085540.

E-mail address: cassio.loss@ibest.com.br (C.M. Loss).

central nervous system development, can cause short- and long-term consequences (de Oliveira et al., 2008; Fujikawa, 1995; Kubova et al., 2004; Rice et al., 1998; Sankar et al., 1998).

One of the initial consequences of SE on the developing brain is a rapid neuronal cell death observed in specific areas. Rats submitted to LiCl-pilocarpine-induced SE during the first three weeks of life presented an intense neuronal loss in hippocampus, amygdala, thalamus and temporal cortical regions (such as perirhinal and entorhinal cortices) (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2004; Sankar et al., 1998). SE-induced nerve cell damage was considered to occur through both necrosis and apoptosis, whereas eosinophilic cells and nuclear fragmentation in TUNEL staining was observed in SE-submitted animals (Kubova et al., 2004; Sankar et al., 1998).

In addition to the acute neuronal death, early life-induced SE can cause long-standing structural and functional changes in the brain. Young rats (until 3 weeks old) submitted to SE presented a severe memory impairment in several tasks such as inhibitory avoidance and water maze at adulthood (de Oliveira et al., 2008; Hoffmann et al., 2004; Sayin et al., 2004). Moreover, animals also displayed alterations in their emotional behavior, which was characterized by higher levels of anxiety when exposed to the light–dark box and elevated plus maze (de Oliveira et al., 2008; Sayin et al., 2004).

SE-induced neuronal degeneration has been frequently associated with an excessive activation of NMDA ionotropic glutamate receptors (NMDAR) (Holopainen, 2008) and previous studies have demonstrated that pretreatment with NMDAR antagonists is neuroprotective against SE-induced neuronal death (Clifford et al., 1990; Fujikawa, 1995; Holmes, 2004). However, despite the treatment of patients with SE started after onset of seizures, there are no studies investigating the effects of NMDAR blockage during SE. Thus, it becomes important to know the effectiveness of post-SE onset treatments with NMDAR antagonists in order to avoid the short- and long-lasting alterations induced by SE.

Therefore, the aim of this study was to investigate the putative protective action of a post-SE onset treatment with ketamine, a non-competitive NMDAR antagonist, on SE-induced neuronal death as well as on long-term behavioral alterations in animals submitted to SE early in life.

2. Results

2.1. Effect of ketamine on LiCl-pilocarpine-induced SE

The convulsive pattern presented by LiCl-pilocarpine-treated animals was similar to that described by de Oliveira et al. (2008). Systemic administration of LiCl-pilocarpine produced defecation, salivation, body tremor, and scratching within 2 to 8 min. This behavioral pattern progressed within 8 to 13 min to increased levels of motor activity and culminated in SE in all animals. SE was characterized by sustained orofacial automatisms, salivation, chewing, forelimb clonus, loss of righting reflex and falling.

Animals treated with ketamine after SE onset presented a distinct behavioral pattern of seizures when compared with LiCl-pilocarpine rats. Five minutes after antagonist administration, both groups that received ketamine at 15 min

(SE+KET15) or at 60 min (SE+KET60) showed a reduction in the intensity of sustained orofacial automatisms, forelimbs clonus and chewing, without recovery of the loss of righting reflex. The SE-induced motor activity was stopped only 70 min after SE onset for both ketamine-treated groups. Ketamine when administered at doses higher than 45 mg/kg, caused death in all SE-induced animals (data not shown). Animals from ketamine group (KET) showed symptoms of anesthesia, such as sedation, 2 min after ketamine administration and were recovered 45 min later.

2.2. Effect of ketamine on SE-induced neurodegeneration

By using Fluoro-Jade C (FJC) staining in brain sections, a large number of degenerative neuronal cells were observed in brains from SE group (Fig. 1). The FJC-positive staining cells showed a bright green color in the somas and fine processes with neuronal profiles (Fig. 1 inserts). LiCl-pilocarpine administration induced a massive neurodegeneration in several brain regions, including CA1 hippocampal subfield, habenula (lateral habenular nucleus), thalamus (ventral posteromedial thalamic nucleus) and amygdala (medial amygdaloid nucleus) 24 h after SE onset (Fig. 1). Both ketamine post-SE onset treated groups presented a significant reduction in the number of FJC-positive neurons (85–100%) in all brain regions analyzed (Table 1). FJC-positive neurons were not observed in brain regions from control (CTRL) and KET groups.

2.3. Effect of SE and ketamine on locomotor and exploratory activities

The pattern of distance traveled, and number of animals rearing and grooming across time were similar in all groups (Fig. 2A–C). All animals showed intra-session habituation to apparatus approximately 7 min after the starting of the session. There were no differences in other parameters of locomotor and exploratory activities, temporal organization and spatial distribution in all groups (Fig. 2D–F and supplementary Fig. S1 A–F). Moreover, all groups showed a similar pattern of inter-session habituation of the distance traveled, and number of animals rearing and grooming during the three days of testing (data not shown).

2.4. Effect of SE and ketamine on anxiety-like behaviors

Animals from SE and KET groups spent significantly low time in open arms (62.9 ± 16.8 and 40.1 ± 6.9 , respectively; $F=6.626$; $p=0.0004$) when compared to the CTRL group (150.1 ± 10.3) (Fig. 3A). Ketamine post-SE onset treatment in both times (SE+KET15 and SE+KET60) increased the time spent in open arms (115.9 ± 15.3 and 101.5 ± 19.2 , respectively), however these values were not different from both CTRL and SE groups. SE+KET15 and SE+KET60 groups, when compared with only KET, spent more time in open arms. The number of risk assessment behaviors was significantly increased in the KET group (7.3 ± 1.4) when compared to the CTRL and SE+KET60 groups (2.8 ± 0.6 and 2.6 ± 0.6 , respectively) (Fig. 3B; $F=4.679$; $p=0.0038$). Animals from SE (7.0 ± 1.4), SE+KET15 (4.1 ± 0.9), SE+KET60 and CTRL groups presented similar levels of risk assessment behaviors. All groups presented similar number of

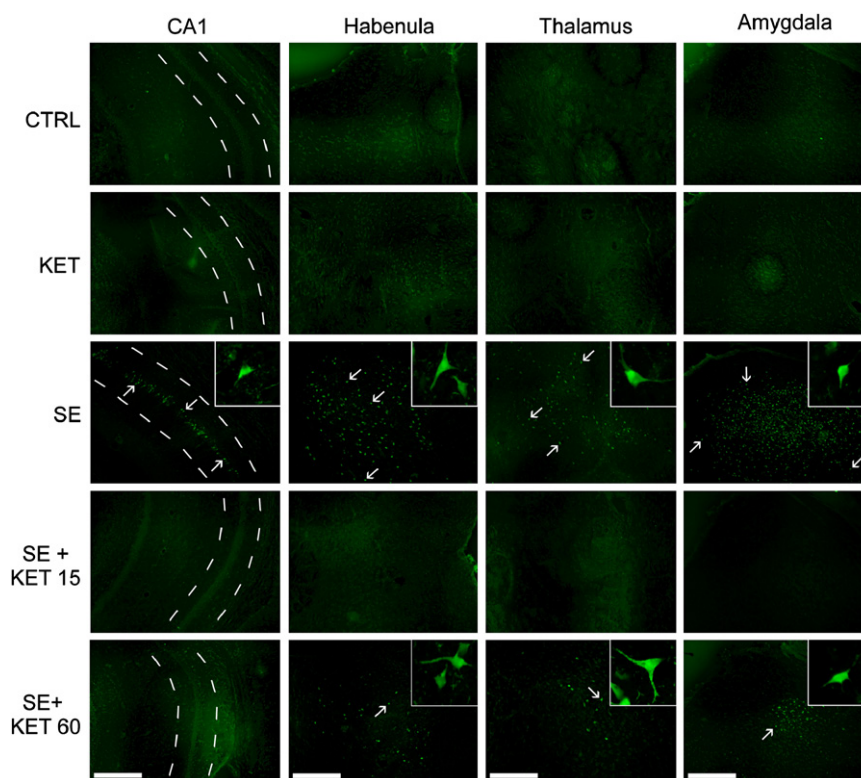


Fig. 1 – SE induced neurodegeneration. Coronal sections show a markedly decreased number of FJC-labeled neurons from brain sections of SE+KET15 and SE+KET60 treated animals when compared with SE animals. Area between the dashed lines represents the CA1 hippocampal subfield. Arrows indicate FJC-positive labeled neurons. Inserts showed a high magnification (1000 ×) of FJC-positive labeled neurons. N=4 animals/group. Scale bars=300 μm.

Table 1 – Number of Fluoro-Jade C positive cells.

Group	Brain structures			
	CA1	Habenula	Thalamus	Amygdala
CTRL	NF**	NF**	NF**	NF**
KET	NF**	NF**	NF**	NF**
SE	76.5 ± 18.5	150.5 ± 15.5	72.5 ± 3.5	566.5 ± 141.5
SE+KET15	NF**	NF**	NF**	4.7 ± 2.9*
SE+KET60	3.2 ± 1.5**	22.7 ± 8.3**	8.5 ± 2.3**	60.7 ± 24.5*
one-Way ANOVA F value	36.63	69.96	242.7	28.03
one-Way ANOVA p value	0.0004	<0.0001	<0.0001	0.0009

N=4 animals/group. NF indicates that FJC-positive cells were not found; *= $p < 0.01$ as compared to SE group; **= $p < 0.001$ as compared to SE group. All data were analyzed by One-Way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

total entries in both open and closed arms (Fig. 3C; $F=2.262$; $p=0.0816$).

3. Discussion

SE when occurred during brain development may cause acute neurodegeneration followed by behavioral and cognitive deficits later in life (Holmes, 1997; van Esch et al., 1996). The acute neuronal loss induced by SE is associated with NMDAR-mediated glutamatergic excitotoxicity whereas several studies have reported that pretreatments with NMDAR antagonists are effective in preventing neuronal damage (Clifford et al., 1990; Fariello et al., 1989; Fujikawa, 1995).

Nevertheless, to our knowledge there are few studies investigating the action of a post-SE onset treatment with NMDAR antagonists on SE-induced brain consequences. In this way, the goal of our study was to investigate the protective role of a post-SE onset treatment with ketamine on neuronal death and long-term behavioral alterations caused by LiCl-pilocarpine SE model.

Previous studies showed that a pretreatment with ketamine reduced intensity and duration of epileptic seizures in metrazol, bicuculline, picrotoxin, pentylentetrazol and electrical stimulus animal models (Mikolasova et al., 1994; Velisek et al., 1989; Veliskova et al., 1990). In our study, treatment with ketamine after SE onset presents similar effect in both times tested. However, latency to stop motor activity was

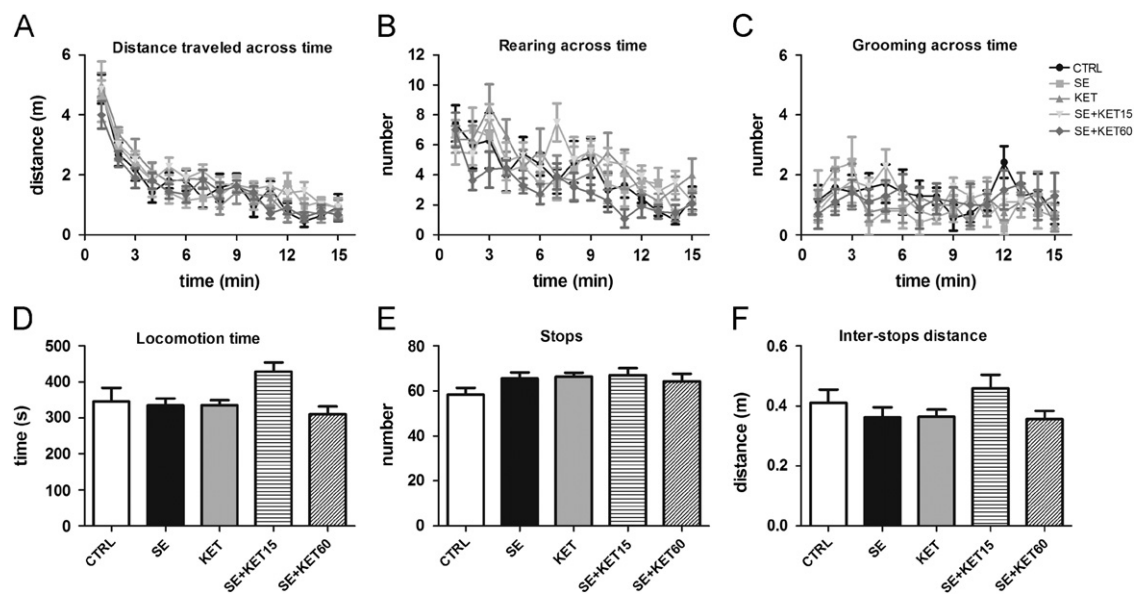


Fig. 2 – Profile of locomotion and exploration in open field task. Profile of distance traveled, number of animals grooming and number of rearing across time (A, B and C, respectively). End point results of (D) locomotion time, (E) number of stops and (F) inter-stop distance. $N=6-11$ animals/group.

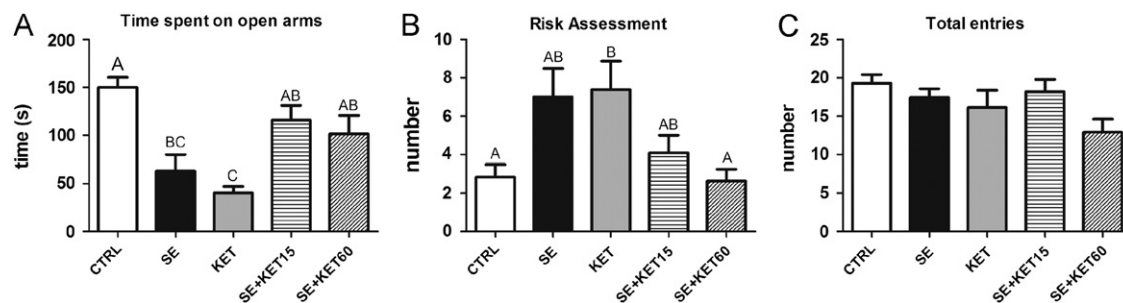


Fig. 3 – Effects of SE and ketamine administration in EPM. Data shows time spent in the open arms (A); number of risk assessment behaviors (B); and number of total entries in both (open and closed) arms (C). $N=6-11$ animals/group. Different letters represent significant differences between groups. All data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

shorter in animals that received ketamine at 60 min after pilocarpine than those at 15 min. This apparent improved efficacy of SE+KET60 may be related to action mechanisms of pilocarpine, that activates muscarinic cholinergic receptors in the seizure initiation (<30 min) but not in seizure maintenance and progression (>60 min), which is performed primarily by NMDAR (Fujikawa, 1995; Rice and DeLorenzo, 1998). Although we cannot exclude the possibility that ketamine-induced decrease of motor manifestations does not reflect a reduction in epileptic activity on the brain, previous studies have showed a robust relationship between electroencephalographic and motor activities in the LiCl–pilocarpine SE model (Hirsch et al., 1992; Sankar et al., 1998).

In addition to reducing the severity and duration of seizures, the ketamine post-SE onset treatment also significantly reduced neurodegeneration observed in all SE-submitted animals. Similar to previous studies (de Oliveira et al., 2008; Sankar et al., 1998), SE induced a massive neuronal death in several brain regions. Excessive activation of NMDAR during SE induces a marked Ca^{2+} influx which can

lead to metabolic derangements and subsequent neuronal death (Hardingham et al., 2002; Holmes, 1997; Olney, 2003; Sankar et al., 1998). Blockage of these receptors by ketamine prevented the SE-induced neuronal death in all brain regions from both ketamine groups (Table 1). Moreover, the metabolic events that lead to neuronal death appear to be time-dependent, whereas the ketamine-blockage of NMDAR at 15 min after pilocarpine was more neuroprotective than that observed at 60 min of treatment. These findings suggest that the triggering events of neuronal death in the immature brain occur in a time window between 15 and 60 min after SE onset.

Besides reducing seizures and neuronal death, ketamine administration during prolonged epileptic activity also acted against the long-term behavioral changes caused by SE. In accordance with other studies (de Oliveira et al., 2008; Sayin et al., 2004), SE animals showed greater anxiety levels in the elevated plus maze (EPM) when compared with non-SE animals. Ketamine post-SE onset treatment partially reduced the increased anxiety-like behaviors observed in SE animals (Fig. 3). This reduction in anxiety levels may be related to

prevention of neurodegeneration, especially in limbic system areas, such as hippocampus, thalamus and amygdala (Fig. 1). Hippocampus projects to the prefrontal cortex and has some closely connected reciprocal projections to amygdala (Bannerman et al., 2004). Thus, both hippocampal and amygdalar lesions observed after SE, may potentially be accountable by altered emotionality of animals, mainly by strong connectivity between these two limbic structures which may have an important role in brain processes associated with anxiety-like behaviors (Bannerman et al., 2004). In addition to that, thalamocortical axonal projections are responsible for conveying peripheral sensory stimuli to primary sensory cortex (Wimmer et al., 2010). Current studies (Meyer et al., 2010a, 2010b; Wimmer et al., 2010) show that ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM) and posteromedial nucleus (POm) projections establish vertical axon bundles in the vibrissal cortex through two separate pathways, lemniscal (projection arising from VPM cells) and paralemniscal (projection from POm cells) (Jones, 2002). These two pathways can regulate the same neurons in vibrissal cortex simultaneously (Wimmer et al., 2010). The elevated neuronal loss induced by SE in VPM could disrupt these regulatory processes, leading to changes in vibrissae perception, and, consequently, elevating the expression of anxiety-like behaviors in EPM task.

Nevertheless, even if ketamine post-SE onset treatment has completely avoided neurodegeneration, the anxiety-like behaviors found in these animals were only partially prevented, suggesting that SE can induce behavioral changes independently of neuronal death. Previous works using a model of febrile seizures found physicochemical alterations in hippocampal and amygdalar neurons which were not accompanied by significant DNA fragmentation (Bender et al., 2003; Chen et al., 2001; Dube et al., 2000). In addition, Hoffmann et al. (2004) observed cognitive impairment in the water maze test in the LiCl–pilocarpine model even in absence of cell loss. In our study, ketamine-blockage of NMDAR in non-SE young rats resulted in enhanced anxiety levels later in life, which adds further support to the hypothesis that emotional behavioral changes can occur separately of neuronal death.

Long-term consequences, such as altered emotionality, caused by ketamine in non-SE rats can be related to ketamine influence on physiological pathways. Blockage of NMDAR in normal conditions can affect physiological processes such as long-term responses and neural plasticity. A recent study observed pro-oxidant effects of ketamine on the central nervous system after a single ketamine administration which may be related to anxiety-like behaviors (da Silva et al., 2010). However, more investigations are needed to unravel the mechanisms that mediate these effects.

In the open field task, we evaluated the spatio-temporal profile of locomotion and exploitation of animals in order to identify the strategies used by them in exploring a new environment. In agreement with de Oliveira et al. (2008), we did not find any difference among groups in the locomotor and exploratory activities as well as in temporal and spatial organization of behavior. These findings strengthen the hypothesis of an increase in levels of anxiety induced by SE in EPM, demonstrating that changes in anxiety-like behaviors are not due to differences in exploratory strategies.

In summary, we have shown in this study that ketamine intervention is able to prevent SE-induced neuronal death in young rats. Moreover, ketamine prevented the anxiogenic effect of SE in adult rats submitted to prolonged epileptic activity early in life. These findings suggests that ketamine was effective in prevent excessive neuronal activity, abnormal, and hypersyncronic, thereby avoiding the evolution of the seizure pattern. Moreover, our results suggests possible adverse effects of ketamine alone, and more studies are needed to understand these effects.

4. Experimental procedure

4.1. Materials

Pilocarpine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (USA), ketamine hydrochloride was purchased from Agener União (Brazil), and Fluoro-Jade C was purchased from Chemicon, Inc. (USA). Other chemicals were purchased from Nuclear (Brazil).

4.2. Subjects

Sixty-one male young Wistar rats (15 postnatal days—PND15) were obtained from local breeding. The litters were culled to 7 pups. The day of birth was defined as day 0 and the animals were weaned on PND21. After weaning, animals were housed in standard polypropylene cages in groups of 4–5 animals with food and water ad libitum. Animals were maintained under a 12 h controlled light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 a.m.) with the room temperature adjusted to 21 ± 2 °C. The handling and care of animals were conducted according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals from National Institutes of Health. All procedures were approved by the Ethic Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number 2008058).

4.3. Induction of status epilepticus

Rat pups were injected with a solution of LiCl (3 mEq/kg i.p.) 12–18 h prior to pilocarpine (60 mg/kg i.p.—SE group) administration on PND16 (de Oliveira et al., 2008). The volume of injection was 10 ml/kg. Control animals were handled and housed in the same manner as experimental animals and received an equal volume of saline (0.9% NaCl i.p.—CTRL group) or ketamine (22.5 mg/kg i.p.—KET group). Fifteen (SE+KET15 group) or 60 min (SE+KET60 group) after pilocarpine administration, pups received ketamine (22.5 mg/kg i.p.). Rats were put in individual plastic cages at 34 °C (nest temperature) for observation of seizures during 3 h. The manifestation of SE was evaluated only by behavioral measures. Rats were allowed to spontaneously recover from SE. The body weight was assessed daily until the weaning. Each experimental group contained pups from several litters. After SE induction, animals were divided into two main subsets. The first subset was used to determine the SE-induced neuronal loss (Fluoro-Jade C staining) and the second subset was submitted to behavioral tasks in adulthood. According to

data obtained by Priel et al. (1996), the occurrence of spontaneous seizures in adult rats was not monitored.

4.4. Fluoro-Jade C staining

The FJC staining was performed as described by Schmued et al. (2005). Briefly, 24 h after SE induction rats were deeply anesthetized i.p. with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) and sequentially perfused through the heart with 200 mL of ice-cold 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, followed by 100 mL of ice-cold fixative solution 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed and immersed overnight in fixative solution followed by 30% sucrose until the brains sank to the bottom of the chamber. Coronal slices (30- μ m) were obtained using a Leica VT1000S vibroslicer and mounted onto gelatin-coated slides and dried at room temperature overnight. For staining, slides were immersed in a basic alcohol solution consisting of 1% sodium hydroxide in 80% ethanol for 5 min. They were then rinsed for 2 min in 70% ethanol, 2 min in distilled water, and then incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10 min. After rinsing with distilled water for 2 min, the slides were then transferred for 10 min to a 0.0001% FJC solution dissolved in 0.1% acetic acid, washed three times for 1 min with distilled water, dried at room temperature overnight, dehydrated in xylene, and cover slipped. Sections were analyzed using a Nikon Eclipse E600 epi-fluorescence microscope. Cell counts for FJC-positive neuronal cells were performed in coronal brain sections on representative microscopic fields corresponding to plate 32 of Paxinos and Watson (1998). Areas of interest were demarcated using the software NIS-Elements Version 3.10 (Nikon Instruments Inc., USA), and the number of neurons were counted by the same software. According to Wang et al. (2008), cells exhibiting bright green fluorescence and profiles of neuronal somas were counted while FJC-positive fragments were not counted.

4.5. Behavioral procedures

Open-field and EPM tasks were carried out on PND75–77 and PND80, respectively. Before each behavioral task, rats were placed in the test room (temperature 21 ± 2 °C) for one hour to allow habituation with the environment and researcher. All tasks were performed between 1:00 and 6:00 p.m. The behavior was recorded and analyzed using the ANY-Maze video-tracking system (Stoelting, CO). Between each trial, apparatuses were cleaned with ethanol 70%.

4.6. Open field

Open field was performed in order to identify the strategies used by animals in exploring a new environment. The test consisted of a circular wooden black arena of 60 \times 50 cm (diameter \times height). The floor of the apparatus was virtually divided into 28 squares (12 central and 16 peripheral). The testing room was illuminated by two lamps directed to the ceiling. The light intensity was 15 lx in the center of the arena. Each animal was individually placed in the periphery of the arena and was left free to explore it for 15 min. Based on studies performed by Eilam (2003) and Li et al. (2010),

spatio-temporal organization of locomotor and exploratory activities were quantified as follows:

4.6.1. Level of locomotor and exploratory activities:

(a) Total number of rearing and grooming. (b) Distance traveled: overall distance that animals traveled during the 15 min observation. (c) Locomoting time: overall duration of locomoting periods, during which animals accumulated the traveled distance. (d) Number of stops: the incidence of “non-locomoting” intervals that were bound by “locomoting” intervals. (e) Inter-stops distance: the metric distance traveled between two consecutive stops (total distance divided by total number of stops).

4.6.2. Temporal organization of locomotion

(a) Number of trips: by ranking squares (places) according to the accumulated “non-locomoting” intervals, the place with the highest rank was termed “home-base”. Intervals between consecutive stops at home-base were scored as “trips” to the arena. (b) Trip length: metric distance traveled in a round-trip (=total distance divided by total number of trips). (c) Stops/trip: number of stops taken between two successive stops at the home-base (=total number of stops divided by total number of trips).

4.6.3. Spatial distribution

(a) Distance traveled along the perimeter: traveled distance along the vicinity of the walls of the arena. (b) Locomoting time spent along the perimeter: traveling time along the vicinity of the walls of the arena. (c) Time spent on home-base.

4.7. Elevated plus maze

EPM was used to assess anxiety-like behaviors. The maze consisted of two open arms (50 \times 10 cm) and two closed arms (50 \times 10 \times 40 cm) with the arms of each type opposite to each other. The maze was elevated to a height of 50 cm off the floor. The experiment was conducted in a room illuminated by red light. The light intensity at the center of the apparatus was 5 lx. Rats were placed in the maze center facing the open arm and they were left free to explore the apparatus for 5 min. The following parameters were analyzed:

4.7.1. Anxiety levels

(a) Time spent in the open arms. (b) Number of risk assessment behaviors: number of times at exploration of the open arm through stretch-attend posture (when the rodent is motionless in center- or closed-zone, but has its body stretched forward into the open arms by placing some but not all paws, returning then to the same position).

4.7.2. Exploratory activity in the apparatus

Total number of entries in both open and closed arms.

4.8. Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm S.E.M. and were analyzed by One-way ANOVA followed by the Tukey's Multiple Comparison post hoc test for unequal samples. $P < 0.05$ was considered significantly.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies, CNPq, FAPERGS, CAPES and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” 01.06.0842-00. We confirm that we have read the Journal’s position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.046>.

REFERENCES

- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–283.
- Bender, R.A., Dube, C., Gonzalez-Vega, R., Mina, E.W., Baram, T.Z., 2003. Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13, 399–412.
- Chen, J.W., Wasterlain, C.G., 2006. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol.* 5, 246–256.
- Chen, K., Aradi, I., Thon, N., Eghbal-Ahmadi, M., Baram, T.Z., Soltesz, I., 2001. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat. Med.* 7, 331–337.
- Clifford, D.B., Olney, J.W., Benz, A.M., Fuller, T.A., Zorumski, C.F., 1990. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia* 31, 382–390.
- da Silva, F.C., do Carmo de Oliveira Cito, M., da Silva, M.I., Moura, B.A., de Aquino Neto, M.R., Feitosa, M.L., de Castro Chaves, R., Macedo, D.S., de Vasconcelos, S.M., de Franca Fonteles, M.M., de Sousa, F.C., 2010. Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice. *Brain Res. Bull.* 83, 9–15.
- de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Goncalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Souza, D.O., e Souza, T.M., Wofchuk, S., 2008. 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* 49, 842–852.
- Dube, C., Chen, K., Eghbal-Ahmadi, M., Brunson, K., Soltesz, I., Baram, T.Z., 2000. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann. Neurol.* 47, 336–344.
- Eilam, D., 2003. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav. Brain Res.* 142, 53–62.
- Fariello, R.G., Golden, G.T., Smith, G.G., Reyes, P.F., 1989. Potentiation of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by an NMDA receptor antagonist. *Epilepsy Res.* 3, 206–213.
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36, 186–195.
- Gross-Tsur, V., Shinnar, S., 1993. Convulsive status epilepticus in children. *Epilepsia* 34 (1), S12–S20.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., Bading, H., 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5, 405–414.
- Hirsch, E., Baram, T.Z., Snead 3rd, O.C., 1992. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 583, 120–126.
- Hoffmann, A.F., Zhao, Q., Holmes, G.L., 2004. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the “two-hit hypothesis”. *Epilepsy Behav.* 5, 873–877.
- Holmes, G.L., 1997. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia* 38, 12–30.
- Holmes, G.L., 2004. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 10, 101–105.
- Holopainen, I.E., 2008. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem. Int.* 52, 935–947.
- Jones, E.G., 2002. Thalamic organization and function after Cajal. *Prog. Brain Res.* 136, 333–357.
- Kubova, H., Mares, P., Suchomelova, L., Brozek, G., Druga, R., Pitkanen, A., 2004. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3255–3265.
- Li, C.R., Huang, G.B., Sui, Z.Y., Han, E.H., Chung, Y.C., 2010. Effects of 6-hydroxydopamine lesioning of the medial prefrontal cortex on social interactions in adolescent and adult rats. *Brain Res.* 1346, 183–189.
- Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Hemberger, M., Bruno, R.M., de Kock, C.P., Frick, A., Sakmann, B., Helmstaedter, M., 2010a. Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex.* 20, 2287–2303.
- Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Oberlaender, M., de Kock, C.P., Sakmann, B., Helmstaedter, M., 2010b. Number and laminar distribution of neurons in a thalamocortical projection column of rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex.* 20, 2277–2286.
- Mikolasova, R., Velisek, L., Vorlicek, J., Mares, P., 1994. Developmental changes of ketamine action against epileptic afterdischarges induced by hippocampal stimulation in rats. *Dev. Brain Res.* 81, 105–112.
- Olney, J.W., 2003. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 101–109.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. vol. 4. Academic Press, San Diego.
- Priel, M.R., dos Santos, N.F., Cavalheiro, E.A., 1996. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 26, 115–121.
- Rice, A.C., DeLorenzo, R.J., 1998. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res.* 782, 240–247.
- Rice, A.C., Floyd, C.L., Lyeth, B.G., Hamm, R.J., DeLorenzo, R.J., 1998. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. *Epilepsia* 39, 1148–1157.
- Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G., 1998. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J. Neurosci.* 18, 8382–8393.
- Sayin, U., Sutula, T.P., Stafstrom, C.E., 2004. Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. *Epilepsia* 45, 1539–1548.
- Schmued, L.C., Stowers, C.C., Scallet, A.C., Xu, L., 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035, 24–31.
- van Esch, A., Ramlal, I.R., van Steensel-Moll, H.A., Steyerberg, E.W., Derksen-Lubsen, G., 1996. Outcome after febrile status epilepticus. *Dev. Med. Child. Neurol.* 38, 19–24.

-
- Velisek, L., Mikolasova, R., Blankova-Vankova, S., Mares, P., 1989. Effects of ketamine on metrazol-induced seizures during ontogenesis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 405–410.
- Veliskova, J., Velisek, L., Mares, P., Rokyta, R., 1990. Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 667–674.
- Wang, L., Liu, Y.H., Huang, Y.G., Chen, L.W., 2008. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res.* 1241, 157–167.
- Wimmer, V.C., Bruno, R.M., de Kock, C.P., Kuner, T., Sakmann, B., 2010. Dimensions of a projection column and architecture of VPM and P0m axons in rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex.* 20, 2265–2276.

CAPÍTULO II

Blockade of GluN2B-containing NMDA receptors reduce neurodegeneration induced by status epilepticus early in life

Cássio Morais Loss*, Milena Lemos Oliveira, Thainá dos Santos Garbino, Sandro Daniel Córdova, Diogo Losch de Oliveira

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *BRAIN RESEARCH*

Blockade of GluN2B-containing NMDA receptors reduce neurodegeneration induced by status epilepticus early in life

Cássio Morais Loss*^a, Milena Lemos Oliveira^a, Thainá do Santos Garbino^a, Sandro Daniel Córdova^a, Diogo Losch de Oliveira^a

^aDepartment of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul – Brazil

* Corresponding authors:

Cássio Morais Loss, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, RS, BRAZIL. Phone: +55 51 33085555. Fax: +55 51 33085540. E-mail: cassio.loss@ibest.com.br

Diogo Losch de Oliveira, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo. Zip code: 90035-003, Porto Alegre, RS, BRAZIL. Phone: +55 51 33085555. Fax: +55 51 33085540. E-mail: losch@ufrgs.br

ABSTRACT

Status epilepticus (SE) when occurred during brain development can cause short- and long-term consequences, which are frequently associated to NMDA-mediated glutamatergic excitotoxicity. The aim of this study was to investigate the role of GluN2B-containing NMDA receptors on the SE-induced neurodegeneration in young rats. Sixty-six Wistar rats (16 postnatal days) were injected with pilocarpine (60 mg/kg i.p.) 12-18 h after LiCl (3 mEq/kg). Fifteen minutes after pilocarpine administration, animals received vehicle (0.9% NaCl i.p. - SE group), or CP-101,606 (10 mg/kg, i.p. - SE+CP group) or CI-1041 (10 mg/kg, i.p. - SE+CI group). Control animals received an equal volume of saline i.p. (CTRL group) instead of pilocarpine. One or 7 post-SE days, brains were removed for Fluoro-Jade C staining. Blockage of GluN2B-containing NMDA receptors by CP-101,606 or CI-1041 was not able to terminate LiCl-pilocarpine-induced SE. All groups SE-submitted showed a significant loss of weight 24h after SE induction. The gain of weight in the subsequent days were similar among groups. Mortality was 33%, 17% and 6% for SE, SE+CP and SE+CI groups, respectively. SE group presents an intense neuronal degeneration in hippocampus, thalamus and amygdala 1 and 7 days after the insult. Blockade of GluN2B-containing NMDA receptors reduces damage in hippocampus and amygdala, but not in thalamus. Our results indicate that GluN2B are involved in neurodegeneration induced by SE, and that blockage of these receptors is insufficient to prevent the whole brain damage.

Keywords: epilepsy, CP-101606, CI-1041, pilocarpine, development, neuronal death.

1. INTRODUCTION

Status epilepticus (SE) is a life-threatening neurological disorder with higher incidence during infancy and childhood (Gross-Tsur and Shinnar, 1993; Holmes, 1997). SE is defined as a seizure or repeated seizures lasting than 30 min (Chen and Wasterlain, 2006) and it has been reported to cause short- and long-term consequences when occurred during central nervous system development (de Oliveira et al., 2008; Fujikawa, 1995; Kubova et al., 2004; Rice et al., 1998; Sankar et al., 1998). Short-term consequences involving a rapid and intense neuronal cell death in some brain regions as hippocampus, amygdala, thalamus and temporal cortex (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2004; Sankar et al., 1998).

Neuronal death caused by SE has been frequently associated to an excessive activation of NMDA ionotropic glutamate receptors (NMDAR) (Holopainen, 2008) and previous studies have demonstrated that the pretreatment with NMDAR antagonists was neuroprotective against SE-induced neuronal death (Clifford et al., 1990; Fujikawa, 1995; Holmes, 2004). Moreover, a recent study showed that young animals subjected to LiCl-pilocarpine-induced SE and treated during seizures with ketamine, a non-selective and noncompetitive NMDAR antagonist, presented total or partial reduction in the number of degenerating neurons in several brain areas (Loss et al., 2012). In addition, ketamine treatment also reduced the behavioral alterations observed during adulthood, which pointed to the involvement of NMDAR in neuronal death and behavioral abnormalities caused by early-life-induced SE (Loss et al., 2012).

Functional NMDARs are heteromeric complexes containing one obligatory GluN1 subunit and some combination of functional GluN2 and/or GluN3 subunits (Di Maio et al., 2011). GluN2A and GluN2B are the predominant subunits of the cerebral

cortex and hippocampus (Cull-Candy et al., 2001; Monyer et al., 1994). Under physiological conditions, NMDAR modulates several intracellular events via Ca^{+2} influx (Di Maio et al., 2011). However, excessive activation of NMDAR, as observed during SE, leads to an increase in the concentration of cytosolic free Ca^{+2} with subsequent neuronal death (Olney, 2003). Previous studies have shown that extrasynaptic NMDAR, which are composed mainly by GluN1 and GluN2B subunits, are responsible for the influx of Ca^{+2} involved in the signaling of neuronal death (Hardingham et al., 2002).

Thus, it becomes extremely important to investigate the effectiveness of selective antagonists for GluN2B-containing NMDA receptors to prevent neuronal death induced by SE early in life.

2. RESULTS

2.1. Convulsive pattern of status epilepticus

The convulsive pattern presented by LiCl-pilocarpine-treated animals was similar to that described by Oliveira et al. (2008). Systemic administration of LiCl-pilocarpine produced defecation, salivation, body tremor, and scratching within 2 to 8 min. This behavioral pattern progressed within 8 to 13 min to increased levels of motor activity and culminated in SE in all animals. SE was characterized by sustained orofacial automatism, salivation, chewing, forelimb clonus, loss of righting reflex and falling.

Blockage of GluN2B-containing NMDA receptors by CP-101606 (SE+CP group) or CI-1041 (SE+CI group) after SE onset did not affect the behavioral pattern of seizures when compared with animals from SE group. Animals treated only with CP-101606 (CP) or CI-1041 group (CI) presented similar behavior of the control group (CTRL).

2.2. Effect of CP-101606 or CI-1041 treatment on mortality

SE led 33% of animals to death within 24 h after SE onset. Administration of NMDAR antagonists reduced mortality to 17% and 6% for CP-101606 or CI-1041 treatment, respectively ($\chi^2_{2} = 16.94$; $P = 0.0046$). Groups that received only vehicle, CP-101606 or CI-1041 without pilocarpine injection presented 0% of mortality.

2.3. Body weight reduction after SE induction

Animals from SE, SE+CP and SE+CI groups presented a significantly weight loss ($\Delta_{16,17} = -4.0 \pm 0.3$; -2.9 ± 0.5 ; and -3.2 ± 0.4 , respectively; $F = 134.2$; $P < 0.0001$) while animals from CTRL, CP and CI groups presented a weight gain one day after

seizure onset (Fig. 1B). However, the weight gain in the subsequent days was similar among groups (Fig. 1).

2.4 Effect of NMDAR containing GluN2B subunit antagonism on SE-induced neuronal degeneration

The FJC-positive staining cells showed a bright green color in the somas and fine processes with neuronal profiles. LiCl-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) 1 and 7 days after SE onset (Fig. 2). CI post-SE onset treated group presented a reduction in the number of FJC-positive neurons in hippocampus and amygdala but not in thalamus. CP post-SE onset treated group did not reduce the number of FJC-positive neurons in all brain regions analyzed. It was not observed FJC-positive neurons in all brain regions from CTRL, CP and CI groups.

3. DISCUSSION

SE when occurred during brain development may cause acute brain damage (Holmes, 1997; van Esch et al., 1996) which is frequently associated to over activation of NMDAR and subsequent glutamatergic excitotoxicity leading to neurodegeneration (Clifford et al., 1990; Fariello et al., 1989; Fujikawa, 1995; Sankar et al., 1998). There are some evidences that signaling pathways responsible by neuronal death are related to Ca^{2+} influx trough NMDAR composed by GluN1/GluN2B subunits (Hardingham et al., 2002). In this way, the goal of our study was to investigate if CP-101606 and CI-1041, both antagonists of NMDAR containing GluN2B subunit, administered during epileptic seizures are protective against neuronal death induced by LiCl-pilocarpine SE model.

Previous studies showed that intensity and duration of seizures were significantly reduced by using NMDAR antagonists before or during seizures (Mikolasova et al., 1994; Velisek et al., 1989; Veliskova et al., 1990). Moreover, there are some reports indicating that blockade of NMDAR containing GluN2B subunit present anticonvulsive effect in adult brain (Brackett et al., 2000). However, in our study we did not observe the same antiepileptic effect of these compounds in development brain. Although we cannot exclude that epileptic activity on the brain had suffered alterations after antagonists administration, previous studies have showed a robust relationship between electroencephalographic and motor activities in LiCl-pilocarpine SE model (Hirsch et al., 1992; Sankar et al., 1998). Therefore, is possible that GluN2B subunit plays a role in maintenance of seizures in adult brain in a different way of the role exerted in an immature brain.

Although the use of CP-101606 and CI-1041 were not effective in stop epileptic activity, the antagonism of NMDAR containing GluN2B subunit with these compounds significantly reduced the mortality of animals. These results are in accordance with

previous studies that demonstrated antagonism of NMDAR containing GluN2B subunit provided a good recovery of individuals that suffered some brain injury as severe head trauma or seizures (Chazot, 2000; Mares and Mikulecka, 2009). Moreover, a protective role of CP-101606 was observed in a study investigating the protective role of NMDAR antagonists in a model of cocaine lethality (Brackett et al., 2000). Thus, GluN2B antagonists seem to be a protective role against SE even in a lack of antiepileptic effect.

Rats treated with pilocarpine showed a significantly weight loss after SE. SE can lead to alterations of physiologic processes, such increase in both muscle and brain oxidative metabolism, leading to metabolic disturbances that might provoke derangement of energy metabolism, causing depletion of energy reserves and consequently reducing the intracellular levels of adenosine triphosphate (Lothman, 1990; Michelson-Kerman et al., 2003). Muscle biopsy of a 12-year-old girl with SE revealed complete depletion of muscle glycogen and increased respiratory chain activity which is due to increased demand for energy substrates leads to increased glycogenolysis and glycolysis during epileptic activity (Michelson-Kerman et al., 2003). Therefore, the excessive activity of the nervous and muscular systems, followed by a depletion of energy reserves may be related to acute weight loss observed in animals subjected to SE. This hypothesis is supported by the fact of epileptic activity had not been reduced by administration of CP-101606 and CI-1041 as well as the loss weight associated to SE there was not prevented by GluN2B antagonism.

Accordingly to previous studies (de Oliveira et al., 2008; Sankar et al., 1998), SE induced a massive neuronal death in several brain regions. Excessive stimulation of NMDAR during SE induces a marked Ca^{+2} influx (Olney, 2003). Elevated levels of cytosolic free Ca^{+2} can lead to metabolic derangements and subsequent neuronal death (Hardingham et al., 2002). The pilocarpine-induced SE leads to upregulation of

expression GluN1 and GluN2B subunits as well as increases NADPH oxidase activity 24 hours after SE onset (Di Maio et al., 2011) which may be involved in the oxidative stress and consequent neuronal death observed during epileptogenesis (Hardingham et al., 2002; Pestana et al., 2010). However, when NMDAR is blocked, both thiol oxidation and overexpression of GluN2B/GluN1 are prevented (Di Maio et al., 2011). These factors could explain the decrease of number Fluoro-Jade C-positive neurons found when CI-1041, but not CP-101606, was administered after pilocarpine in relation with high number of neurons in degeneration detected on SE group. Differences in effectiveness of neuroprotection found in SE+CI and SE+CP groups could be due distinct kinetic and pharmacological properties of these compounds.

Moreover, the lack of neuroprotection in thalamus areas may indicate a more susceptibility of this region to damage induced by SE. Nevertheless, the great number of FJC-positive neurons found in nucleus of thalamus (ventral medial and ventral posteromedial thalamic nucleus) even after GluN2B antagonism could be related to a lower expression of GluN2B subunit in these regions (Khan et al., 2000).

In summary, we have shown in this study that NMDAR containing GluN2B antagonism by CP-101606 and CI-1041 are not able to stop seizures and prevent weight loss induced by SE. However, GluN2B blockage was efficient in reduce mortality of animals and neuronal death in some regions of immature brain. In addition, we observe a more efficacy of CI-1041 than CP-101606 in to prevent brain damage caused by prolonged epileptic activity early in life. Together, these found suggesting that NMDAR containing GluN2B subunit displays an important role in neuronal death induced by SE, but there are other NMDAR subunits involved in SE-induced neurodegeneration since blockage of NMDAR with non-selective antagonists (but not with selective antagonists to NMDAR containing GluN2B subunit) completely prevent neuronal death induced by

SE in young animals. Therefore, more studies are needed to elucidate the composition of NMDAR involved in neurodegeneration induced by SE.

4. EXPERIMENTAL PROCEDURE

4.1. Materials

Pilocarpine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (USA), CP-101606 and CI-1041 were obtained from Pfizer, Ann Arbor (MI, USA), and Fluoro-Jade C was purchased from Chemicon, Inc. (USA). Other chemicals were purchased from Nuclear (Brazil).

4.2. Subjects

Sixty-six young Wistar rats (15 postnatal days – PND15) were obtained from local breeding. The litters were culled to 7 pups. The day of birth was defined as day 0. Animals were housed in standard polypropylene cages with food and water *ad libitum*. Animals were maintained under a 12 h controlled light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 a.m) with the room temperature adjusted to 21 ± 2 °C. The handling and care with animals were conducted according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals from National Institutes of Health. All procedures were approved by the Ethic Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number #21369).

4.3. Induction of status epilepticus

Rat pups were injected with a solution of LiCl (3 mEq/kg i.p.) 12-18 h prior to pilocarpine (60 mg/kg i.p. - SE group) or saline (0.9%) administration on PND16 (de Oliveira et al., 2008). The volume of injection was 5ml/kg. Fifteen min after pilocarpine administration, pups received CP-101606 (10 mg/kg i.p. – SE+CP group), CI-1041 (10 mg/kg i.p. – SE+CI group) or saline (0.9% NaCl i.p. - SE group). Fifteen min after saline injection, control animals received CP-101606 (10 mg/kg i.p. – CP group), CI-

1041 (10 mg/kg i.p. – CI group) or saline (0.9% NaCl i.p. - CTRL group) and were handled and housed as the same manner of experimental animals. Rats were put in individual plastic cages at 34 °C (nest temperature) for observation of seizures during 3 h. The manifestation of SE was evaluated only by behavioral measures. Rats were allowed to spontaneously recover from SE. Pups received i.p. injections of HBSS supplemented with 11 mM glucose 1.5, 4, 6, 24 and 48 h after SE induction. The body weight was assessed daily until the last experimental day. Each experimental group contained pups from several litters. After SE induction, animals were used to determine the SE-induced neuronal loss by Fluoro-Jade C staining.

4.4. Fluoro-Jade C staining

The FJC staining was performed as described by Schmued et al. (2005). Briefly, 1 or 7 days after SE induction rats were deeply anesthetized i.p. with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) and sequentially perfused through the heart with 200 mL of ice-cold 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, followed by 100 mL of ice-cold fixative solution 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed and immersed overnight in fixative solution followed by 30% sucrose until the brains sank to the bottom of the chamber. Coronal slices (50- μ m) were obtained using a Leica VT1000S vibroslicer and mounted onto gelatin-coated slides and dried at room temperature overnight. To staining, slides were immersed in a basic alcohol solution consisting of 1% sodium hydroxide in 80% ethanol for 5 min. They were then rinsed for 2 min in 70% ethanol, 2 min in distilled water, and then incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10 min. After rinsing with distilled water for 2 min, the slides were then transferred for 10 min to a 0.0001% FJC solution dissolved in 0.1% acetic acid, washed three times for 1 min with distilled water, dried at room temperature overnight, dehydrated in xylene, and cover slipped. Sections were

analyzed using a Nikon Eclipse E600 epi-fluorescence microscope. Cell counts for FJC-positive neuronal cells were performed in coronal brain sections on representative microscopic fields corresponding to plate 32 of Paxinos and Watson (1998). Areas of interest were demarcated using the software NIS-Elements Version 3.10 (Nikon Instruments Inc., USA), and the number of neurons were counted by the own software. Accordingly to Wang et al. (2008), cells exhibiting bright green fluorescence and profiles of neuronal somas were counted while FJC-positive fragments were not counted.

4.8. Statistical analysis

Data of mortality are expressed as percentage and were analyzed by Chi-square. Data of body weight are expressed as mean \pm S.E.M. and were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey's Multiple Comparison post hoc test for unequal samples. $P < 0.05$ was considered significantly.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian funding agencies, CNPq, FAPERGS, CAPES and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00. We confirm that we have read the Journal’s position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

DISCLOSURE STATEMENT

None of the authors has any conflict of interest.

REFERENCES

- Brackett, R.L., Pouw, B., Blyden, J.F., Nour, M., Matsumoto, R.R., 2000. Prevention of cocaine-induced convulsions and lethality in mice: effectiveness of targeting different sites on the NMDA receptor complex. *Neuropharmacology*. 39, 407-18.
- Chazot, P.L., 2000. CP-101606 Pfizer Inc. *Curr Opin Investig Drugs*. 1, 370-4.
- Chen, J.W., Wasterlain, C.G., 2006. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol*. 5, 246-56.
- Clifford, D.B., Olney, J.W., Benz, A.M., Fuller, T.A., Zorumski, C.F., 1990. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia*. 31, 382-90.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 11, 327-35.
- de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Goncalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Souza, D.O., e Souza, T.M., Wofchuk, S., 2008. 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*. 49, 842-52.
- Di Maio, R., Mastroberardino, P.G., Hu, X., Montero, L., Greenamyre, J.T., 2011. Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiol Dis*.
- Fariello, R.G., Golden, G.T., Smith, G.G., Reyes, P.F., 1989. Potentiation of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by an NMDA receptor antagonist. *Epilepsy Res*. 3, 206-13.
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia*. 36, 186-95.
- Gross-Tsur, V., Shinnar, S., 1993. Convulsive status epilepticus in children. *Epilepsia*. 34 Suppl 1, S12-20.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., Bading, H., 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 5, 405-14.
- Hirsch, E., Baram, T.Z., Snead, O.C., 3rd, 1992. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res*. 583, 120-6.
- Holmes, G.L., 1997. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*. 38, 12-30.
- Holmes, G.L., 2004. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev*. 10, 101-5.
- Holopainen, I.E., 2008. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem Int*. 52, 935-47.
- Khan, A.M., Stanley, B.G., Bozzetti, L., Chin, C., Stivers, C., Curras-Collazo, M.C., 2000. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B is widely expressed throughout the rat diencephalon: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 428, 428-49.
- Kubova, H., Mares, P., Suchomelova, L., Brozek, G., Druga, R., Pitkanen, A., 2004. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci*. 19, 3255-65.

- Loss, C.M., Cordova, S.D., de Oliveira, D.L., 2012. Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 1474, 110-7.
- Lothman, E., 1990. The biochemical basis and pathophysiology of status epilepticus. *Neurology.* 40, 13-23.
- Mares, P., Mikulecka, A., 2009. Different effects of two N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on seizures, spontaneous behavior, and motor performance in immature rats. *Epilepsy Behav.* 14, 32-9.
- Michelson-Kerman, M., Waternberg, N., Nissenkorn, A., Gilad, E., Sadeh, M., Lerman-Sagie, T., 2003. Muscle glycogen depletion and increased oxidative phosphorylation following status epilepticus. *J Child Neurol.* 18, 876-8.
- Mikolasova, R., Velisek, L., Vorlicek, J., Mares, P., 1994. Developmental changes of ketamine action against epileptic afterdischarges induced by hippocampal stimulation in rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 81, 105-12.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12, 529-40.
- Olney, J.W., 2003. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol.* 3, 101-9.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Vol. Fourth, Academic Press, San Diego.
- Pestana, R.R., Kinjo, E.R., Hernandez, M.S., Britto, L.R., 2010. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are involved in neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett.* 484, 187-91.
- Rice, A.C., Floyd, C.L., Lyeth, B.G., Hamm, R.J., DeLorenzo, R.J., 1998. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. *Epilepsia.* 39, 1148-57.
- Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G., 1998. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 18, 8382-93.
- Schmued, L.C., Stowers, C.C., Scallet, A.C., Xu, L., 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035, 24-31.
- van Esch, A., Ramlal, I.R., van Steensel-Moll, H.A., Steyerberg, E.W., Derksen-Lubsen, G., 1996. Outcome after febrile status epilepticus. *Dev. Med. Child. Neurol.* 38, 19-24.
- Velisek, L., Mikolasova, R., Blankova-Vankova, S., Mares, P., 1989. Effects of ketamine on metrazol-induced seizures during ontogenesis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 405-10.
- Veliskova, J., Velisek, L., Mares, P., Rokyta, R., 1990. Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 667-74.
- Wang, L., Liu, Y.H., Huang, Y.G., Chen, L.W., 2008. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res.* 1241, 157-67.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Body weight variation. Change in body weight between (A) 15th and 16th days, (B) 16th and 17th days, (C) 17th and 18th days, (D) 18th and 19th days, (E) 19th and 20th days, (F) 20th and 21st days, (G) 21st and 22nd days, (H) 22nd and 23rd days. N = 10 animals/group in 15th-17th days; 5 animals/group in 17th-23rd days. ***= $P < 0.001$. All data were analyzed by one-Way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

Fig. 2. Representative images of neurodegeneration induced by SE 1 and 7 days after administration of pilocarpine. Coronal sections show a markedly decreased number of FJC-labeled neurons from brain sections of SE+CI treated animals when compared with SE animals. Area between dashed line represents the CA1 hippocampal subfield. VM= ventromedial thalamic nucleus; VPM= ventral posteromedial thalamic nucleus; MePV= medial amygdaloid nucleus. Arrows indicate FJC-positive labeled neurons. N = 2-4 animals/group/day. Scale bars= 100 μm .

Figure 1.

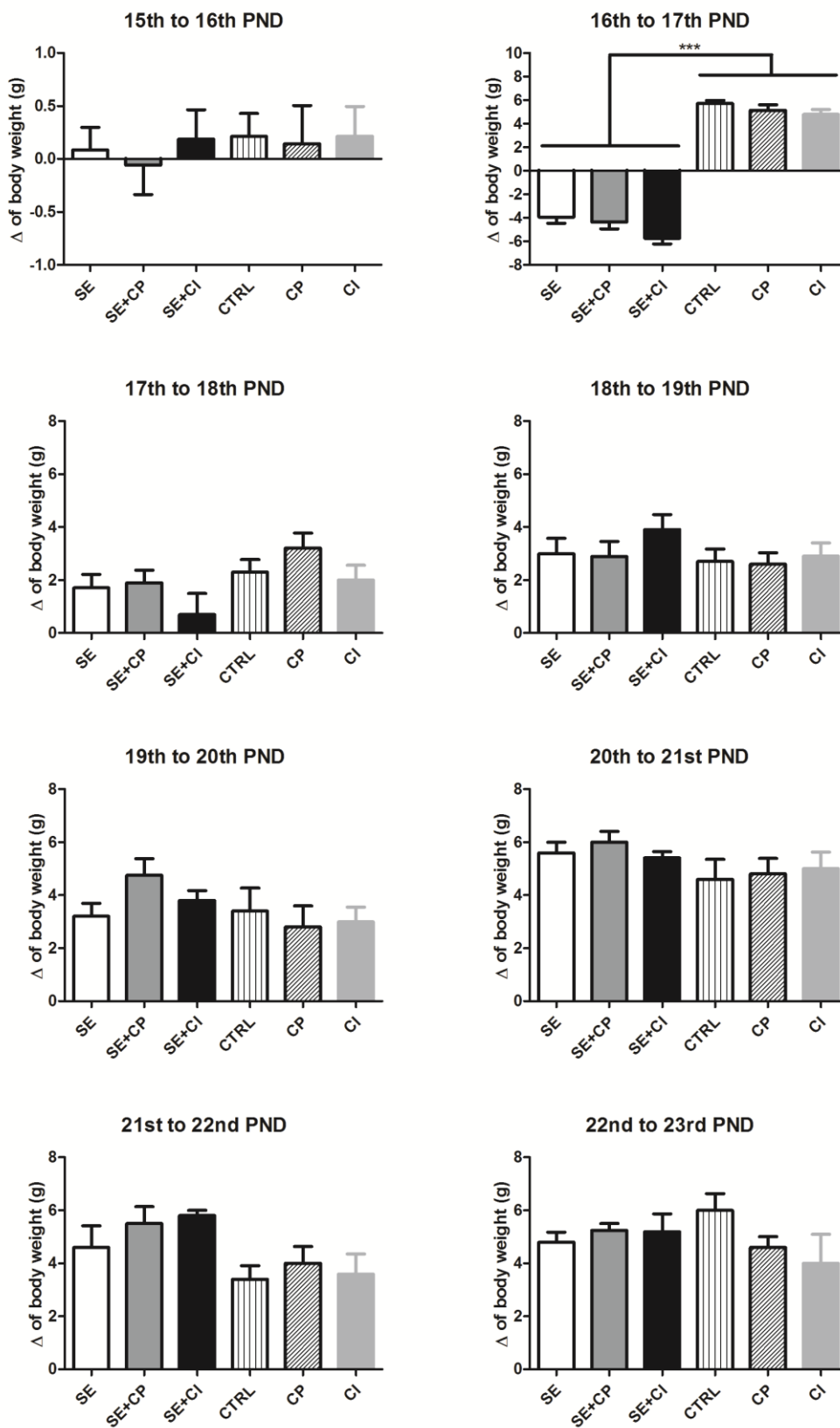
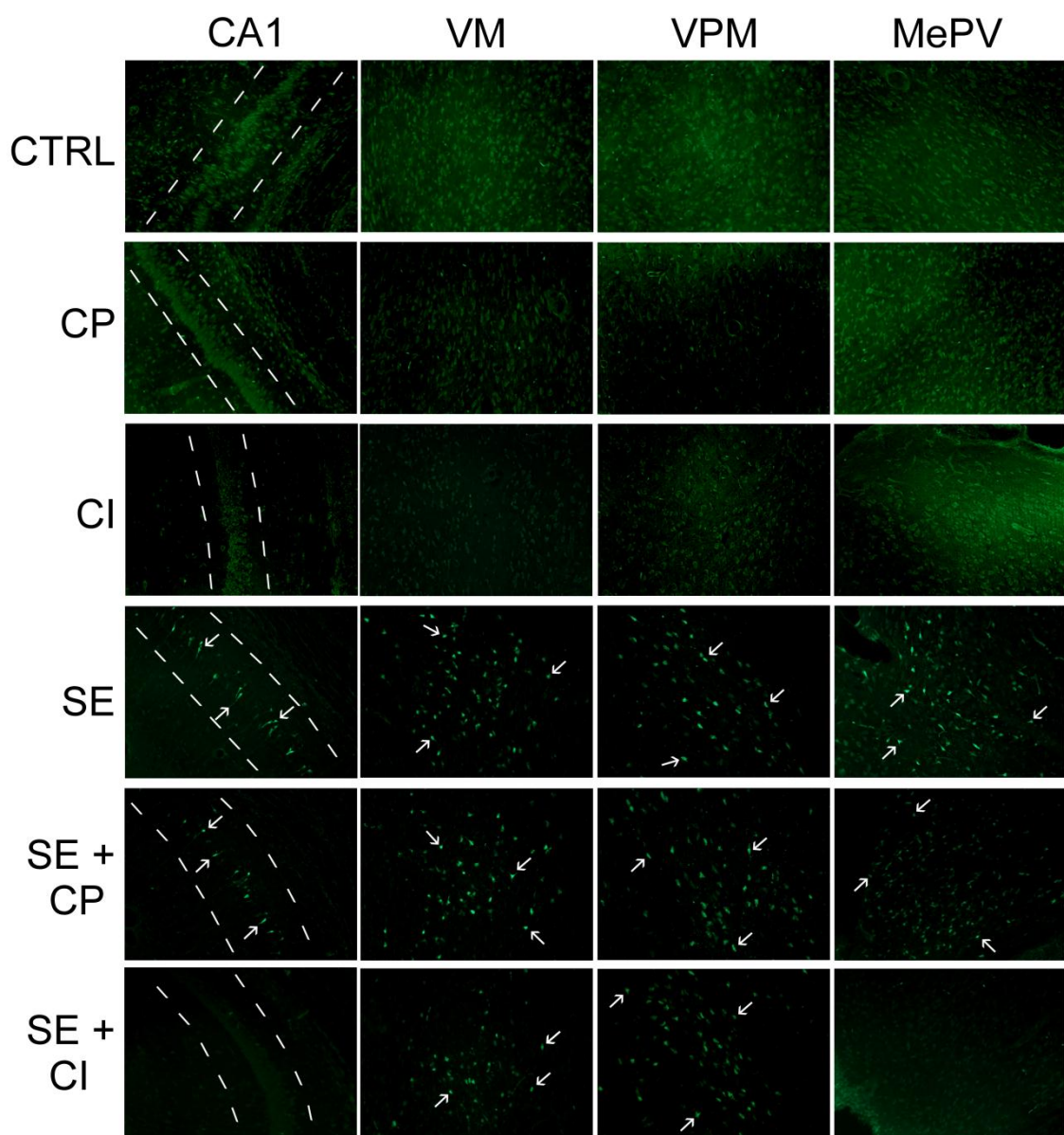


Figure 2.



PARTE III. DISCUSSÃO

A atividade epiléptica prolongada, quando ocorrida durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral, pode levar a alterações permanentes na formação de redes ou circuitos neuronais, uma vez que podem provocar morte neuronal por excitotoxicidade, afetar a neurogênese, a migração neuronal, a arborização neurítica e o estabelecimento de conexões sinápticas (Kaindl e Ikonomidou 2007). Estas alterações podem levar ao surgimento de diversas desordens neurológicas e psiquiátricas na idade adulta, incluindo alterações no comportamento emocional, alterações de humor e déficit cognitivo (Kaindl e Ikonomidou 2007). Neurologistas pediátricos têm descrito frequentemente que indivíduos que sofreram SE durante períodos iniciais do desenvolvimento cerebral apresentam uma elevada morte neuronal em diversas regiões do sistema nervoso com subsequente déficit cognitivo e desenvolvimento de epilepsia na idade adulta (Barnard e Wirrell 1999; Kwong, Chang e Lam 2004). Dados semelhantes são relatados em estudos com animais, nos quais diversos pesquisadores observaram alterações cognitivas e comportamentais em ratos adultos que sofreram SE durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral (Kubova *et al.* 2004; Fabene *et al.* 2007; Kaindl e Ikonomidou 2007; de Oliveira *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008).

A conduta inicial em uma crise prolongada compõe-se das medidas de suporte de vida e de reanimação, apropriadas a todos os pacientes, e uso de uma medicação com início de ação rápido tais como benzodiazepínicos e barbitúricos, os quais possuem mecanismo de ação exercido através da inibição neuronal mediada pelo GABA (Appleton *et al.* 2000; Agertt *et al.* 2005). No entanto, estudos demonstraram que o SE tardio, com duração superior a 30 minutos, além de causar danos cerebrais irreversíveis, torna-se irresponsivo (refratário) aos antiepilépticos tradicionais disponíveis no mercado atualmente (farmacoresistência). Esta farmacoresistência aos antiepilépticos tradicionais (os quais de um modo geral atuam sobre o sistema GABAérgico) tem sido amplamente reportada em estudos envolvendo animais e também seres humanos. Walton e Treiman

(1988) 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. De mesma forma, Kapur e Macdonald (1997) reportaram uma diminuição da potência anticonvulsivante do diazepam em um modelo de SE induzido em ratos. Além disso, Jones *et al.* (2002) observaram que, em animais submetidos ao SE induzido por LiCl-pilocarpina, a administração de diazepam e fenobarbital é eficaz, de maneira dose-dependente (ED_{50} de 1,6 mg/kg), no controle do SE somente se administrado logo após o início das crises pois se administrados 10 minutos após o início das crises a maioria dos animais (92% ou mais) não exibem recuperação. Em humanos, estudos clínicos também demonstraram que o tratamento do SE com diazepam e fenitoína é satisfatório (80% dos pacientes respondem ao tratamento) somente quando estes fármacos são administrados até 30min após o início da crise. No entanto, se administrados após este período de tempo, sua eficácia diminui em 50%.

Neste caso, torna-se de extrema importância a investigação de outros mecanismos celulares e moleculares, envolvendo sistemas de neurotransmissores diferentes do GABAérgico, uma vez que o dano gerado após o SE tem sido frequentemente associado a excitotoxicidade glutamatérgica, principalmente através da excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (NMDAR) (Holopainen 2008). Considerando as evidências descritas acima, neste estudo investigamos a eficácia do bloqueio de NMDAR feito durante crises prolongadas ocorridas em períodos iniciais do desenvolvimento cerebral (P16) sobre as alterações a curto e longo prazo induzidas pelo SE.

Na primeira parte deste trabalho, administrou-se o antagonista não competitivo e não seletivo de NMDAR, cetamina, após o início das crises para avaliar o efeito do bloqueio de NMDAR durante o SE sobre a morte neuronal e as alterações

comportamentais induzidas pelo modelo de LiCl-pilocarpina. Neste trabalho, demonstramos que o SE induzido por LiCl-pilocarpina durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral leva a uma expressiva perda neuronal na região CA1 do hipocampo, na habenula, na amígdala e no tálamo 24 após a convulsão (Capítulo I - Figura 1). Wang e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de pilocarpina em ratos adultos promove morte neuronal em diversas áreas cerebrais até 14 dias após a convulsão, com densa distribuição no córtex e no hipocampo. Embora estudos demonstrem que o cérebro imaturo é relativamente mais resistente a alterações morfológicas causadas por convulsões (Haas *et al.* 2001), alguns trabalhos evidenciaram que o SE pode causar neurodegeneração massiva em diversas regiões cerebrais de ratos jovens, tais como tálamo e hipocampo (Sankar *et al.* 1998; de Oliveira *et al.* 2008; Druga, Mares e Kubova 2010). Estes dados, juntamente com os encontrados em nossos estudos, reforçam a ideia de que apesar de o cérebro imaturo ser mais resistente, ele não é imune ao dano cerebral induzido por crises epiléticas prolongadas.

Além disso, demonstramos que o bloqueio de NMDAR com cetamina evitou o dano gerado pelo SE, observado através do número reduzido de neurônios positivamente marcados para Fluoro-Jade C (Capítulo I - Figura 1), indicando um menor número de neurônios em processo degenerativo. Estudos anteriores já haviam reportado que o pré-tratamento com antagonistas de NMDAR apresentavam-se efetivos contra a morte neuronal induzida pelo SE (Clifford *et al.* 1990; Fujikawa 1995; Holmes 2004). No entanto, em nosso estudo demonstramos que o antagonismo de NMDAR também se mostra efetivo no controle do SE mesmo se administrado após o início das crises epiléticas. É importante ressaltar, que apesar de ser efetivo no controle das convulsões, a eficácia do tratamento com cetamina durante o SE na prevenção da neurodegeneração, assim como os fármacos que atuam sobre o sistema GABAérgico, também parece ser tempo-dependente, uma vez que a intervenção com o antagonista

quando realizada aos 15 min foi mais eficaz do que quando realizada aos 60 min (Capítulo I - Figura 1).

Além disso, em nosso estudo observou-se que animais que receberam cetamina, sem pilocarpina, não apresentaram neurodegeneração nas regiões cerebrais analisadas. Este resultado não está de acordo com alguns estudos prévios os quais demonstraram morte neuronal após o bloqueio de NMDAR durante a infância (Olney, Labruyere e Price 1989; Ikonomidou *et al.* 1999; Slikker *et al.* 2007). A divergência de resultados entre os estudos pode ser explicada pelo fato de que em nosso estudo nós utilizamos uma única injeção de cetamina enquanto que estudos que apontam neurodegeneração induzida por este antagonista NMDAR fazem administrações repetidas ou contínuas de cetamina nos animais (Ikonomidou *et al.* 1999; Slikker *et al.* 2007).

Neste mesmo estudo, além do padrão convulsivo e da neurodegeneração, nós também avaliamos o efeito do bloqueio de NMDAR durante o SE na infância, sobre as alterações comportamentais a longo prazo induzidas pela atividade epiléptica prolongada. Observamos que como em outros estudos, o SE ocorrido na infância induz aumento da expressão de comportamentos do tipo ansioso durante a idade adulta (Sayin, Sutula e Stafstrom 2004; de Oliveira *et al.* 2008). Este efeito ansiogênico do SE pode ser relacionado à extensiva morte neuronal, principalmente em estruturas que compõem o sistema límbico, tais como hipocampo, amígdala e tálamo, observada 24 h após a indução das crises epiléticas (Bannerman *et al.* 2004). Além disso, assim como na morte neuronal, o bloqueio de NMDAR com cetamina também foi eficaz na redução das alterações comportamentais induzidas pelo SE. No entanto, apesar de apresentar alta eficácia em reduzir a neurodegeneração, a eficácia em reduzir as alterações comportamentais foi somente moderada, uma vez que os níveis de ansiedade induzidos pelo SE foram apenas parcialmente revertidos (Capítulo I - Figura 3). Estes resultados podem indicar que o SE é capaz de induzir alterações comportamentais

independentemente da ocorrência de morte celular (Dube *et al.* 2000; Chen *et al.* 2001; Bender *et al.* 2003; Hoffmann, Zhao e Holmes 2004). Outra hipótese que não pode ser descartada é que o antagonismo de NMDAR preveniu completamente o dano induzido pelo SE, mas a própria cetamina induziu alterações cerebrais suficientes para evitar a completa reversão das anormalidades comportamentais, como a ansiogênese. Essa hipótese é baseada no fato de que mesmo na ausência de morte celular induzida pelo bloqueio de NMDAR, os animais tratados apenas com cetamina (sem a administração de pilocarpina) apresentaram níveis muito semelhantes de ansiedade que os animais que sofreram SE (Capítulo I - Figura 3). Estes resultados podem estar relacionados com o fato de que o bloqueio de NMDAR em condições normais podem alterar processos fisiológicos como alterações de longo prazo no crescimento dendrítico, plasticidade neural e desenvolvimento da arborização dendrítica (Vutskits *et al.* 2006). Além disso, um estudo recente apontou efeitos pró-oxidante da cetamina no SNC após uma única administração de cetamina (da Silva *et al.* 2010), o que em adição com as alterações citadas anteriormente, podem estar contribuindo para o fenótipo ansiogênico induzido pelo uso da cetamina na infância.

Na segunda parte deste estudo, após identificar que o bloqueio de NMDAR foi capaz de proteger contra a neurodegeneração e as alterações comportamentais induzidas pelo SE, investigamos mais especificamente quais dos tipos de NMDAR estão envolvidos na neurodegeneração induzida pelo SE quando ocorrido em períodos iniciais do desenvolvimento cerebral (P16). Estudos anteriores têm apontado que a composição e a localização dos NMDAR podem refletir diferentes funções destes receptores, sendo que os NMDAR sinápticos (os quais são compostos principalmente pelas subunidades GluN1/GluN2A) ativam cascatas de sinalização necessárias para manutenção e sobrevivência celular, enquanto os NMDAR extrassinápticos (compostos principalmente pelas subunidades GluN1/GluN2B) ativam cascatas de sinalização

envolvidas com o processo de morte celular (Hardingham, Fukunaga e Bading 2002; Li *et al.* 2002; Di Maio *et al.* 2011; Petralia 2012).

Neste trabalho, observamos que diferentemente do bloqueio dos NMDAR através do uso da cetamina (que é um antagonista NMDAR não seletivo, ou seja, antagoniza todos os tipos de NMDAR, pois seu sítio de ligação encontra-se no poro do canal iônico próximo ao sítio de ligação do Mg^{+2}), o bloqueio dos NMDAR extrassinápticos, através do uso do CP-101606 (taxoprodil) ou do CI-1041 (besonprodil), não foi capaz de terminar as crises convulsivas induzidas pelo SE. Levando em consideração que alguns estudos tenham relatado uma robusta relação entre a atividade cerebral e a atividade motora no modelo de SE induzido por LiCl-pilocarpina (Hirsch, Baram e Snead 1992; Sankar *et al.* 1998), nossos resultados sugerem que os NMDAR extrassinápticos não participam na manutenção da atividade epilética neste modelo. Além disso, embora a nossa hipótese aponte para a eficácia da cetamina em controlar a atividade elétrica no SNC, uma vez que a administração de cetamina foi suficiente para parar as manifestações motoras, não há garantias de que a atividade epilética cerebral tenha realmente cessado, uma vez que não foram realizados estudos eletroencefalográficos e a cetamina também tem efeito sobre a musculatura, atuando como relaxante muscular (Sinner e Graf 2008). Desta forma, estudos eletroencefalográficos são necessários para um melhor entendimento da participação dos NMDAR na manutenção das crises epiléticas.

Apesar de o bloqueio dos NMDAR contendo a subunidade GluN2B não serem efetivos contra a atividade epilética, ele foi eficaz na redução da mortalidade em comparação com os animais SE. Inicialmente, baseado nos resultados de peso corporal obtido no primeiro Capítulo deste estudo, nossa hipótese era de que os animais eram levados a óbito devido ao desgaste energético e depleção das reservas energéticas durante a convulsão (Lothman 1990; Michelson-Kerman *et al.* 2003), o que poderia

causar parada cardiorrespiratória e conseqüentemente morte do indivíduo. Resultados obtidos neste estudo mostram que todos os animais que sofreram SE apresentaram uma perda de massa corporal no primeiro dia pós-convulsão (Anexo I e Capítulo II – Figura 1), e os animais que foram induzidos ao SE e após 15 min receberam uma intervenção com cetamina apresentam uma recuperação mais rápida de peso corporal ao longo dos dias do que os que não receberam cetamina (Anexo I). No entanto, dados obtidos no segundo Capítulo deste estudo mostraram que existiu diferença no ganho de peso corporal somente no primeiro dia pós-SE, no qual animais que convulsionaram perdem peso e animais que não convulsionaram ganham peso (Capítulo II – Figura 1). Além disso, mesmo não havendo diferença no ganho de peso corporal entre os grupos que convulsionaram os grupos que sofreram SE e receberam uma intervenção com antagonista de NMDAR contendo a subunidade GluN2B apresentaram mortalidade reduzida em relação aos que não receberam o antagonista. Apesar de estes dados parecerem contraditórios, uma vez que no primeiro estudo animais do grupo SE apresentam diferenças no ganho de peso por pelo menos dois dias pós-convulsão em relação aos animais controles e no segundo trabalho isto ocorre apenas no primeiro dia pós-SE, diferenças nos protocolos utilizados durante e após as convulsões podem ser responsáveis pelos resultados conflitantes obtidos nos dois trabalhos. No primeiro estudo, os animais foram deixados livres para se recuperarem do insulto, enquanto que no segundo estudo os animais receberam injeções i.p. de HBSS (uma solução isotônica balanceada) suplementada com glicose a fim de repor eletrólitos e reidratar os animais durante as convulsões e nos dois primeiros dias subsequentes ao insulto. Desta forma, uma possível recuperação mais rápida dos animais que receberam o antagonista pode ter sido mascarada pela reposição energética administrada durante os períodos mais críticos do insulto (períodos ictal e pós-ictal).

Por fim, observamos ainda que diferentemente da cetamina, os compostos CP-101606 e CI-1041 não foram capazes de reverter totalmente o dano cerebral induzido pelo SE. Animais que sofreram SE e receberam CI-1041 durante as convulsões apresentaram uma redução na neurodegeneração em algumas regiões como hipocampo e amígdala indicando um efeito neuroprotetor deste composto. No entanto, animais que receberam CP-101606 durante o SE não apresentaram redução na degeneração neuronal nas regiões analisadas. Além disso, as regiões do tálamo (núcleo ventral medial e o núcleo ventral postero medial) não apresentaram redução no número de neurônios em degeneração em ambos os casos.

CONCLUSÃO

Juntos, nossos dados sugerem que a morte neuronal induzida por LiCl-pilocarpina ocorre através da ativação de NMDAR. Além disso, existe a participação da subunidade GluN2B no dano neuronal induzido pelo SE, uma vez que o bloqueio destes receptores reduziu, mesmo que parcialmente, a degeneração em algumas regiões. No entanto, a morte neuronal induzida pelo SE não necessariamente ocorre somente via ativação de NMDAR contendo a subunidade GluN2B, especialmente nas regiões talâmicas. Desta forma, nossos dados sugerem existir o envolvimento de outras subunidades do NMDAR, além da GluN2B, no dano neuronal induzido pelo SE.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o SE durante períodos iniciais do desenvolvimento cerebral (P16) resulta em degeneração neuronal até, pelo menos, 7 dias após a convulsão, e que existe o envolvimento de NMDAR neste processo. Além disso, ratos tratados com LiCl-pilocarpina na infância apresentaram alterações a longo prazo na emocionalidade, o que se refletiu na alta expressão de comportamentos do tipo ansioso na idade adulta, sendo que esta alteração foi revertida nos animais que sofreram intervenção com antagonista NMDAR durante o SE. Nossos resultados sugerem, portanto, que o sistema glutamatérgico é um alvo em potencial para o tratamento de

crises epilépticas de difícil controle, e que o antagonismo de NMDAR pode servir, pelo menos, como terapia farmacológica complementar em pacientes que sofrem SE durante a infância.

PARTE IV. PERSPECTIVAS

Considerando que o SE pode ser convulsivo (presença de convulsões) ou não convulsivo (ausência de convulsões) (Sirven e Waterhouse 2003; Raspall-Chaure *et al.* 2006; Rosenow, Hamer e Knake 2007), torna-se interessante e de extrema importância investigar não somente o efeito o antagonismo de NMDAR durante as crises convulsivas sobre as manifestações motoras, mas também analisar eletroencefalograficamente como está a atividade epilética após intervenção com o antagonista NMDAR. Além disso, mesmo com a atividade epilética cessando em torno de 24 h após o início do SE, a morte neuronal é observada até pelo menos 14 dias após o insulto. Desta forma, torna-se importante investigar qual a causa da neurodegeneração ocorrida mesmo após o final da atividade epilética. Portanto, como perspectivas, pretendemos avaliar os efeitos do antagonismo de NMDAR sobre fatores inflamatórios, a fim de verificar se a morte neuronal tardia pode estar sendo induzida pela inflamação do SNC induzida pelo SE. Pretendemos também investigar os efeitos do antagonismo de NMDAR contendo a subunidade GluN2B sobre as alterações a longo prazo induzidas pelo SE, tais como alterações na emocionalidade e na capacidade cognitiva de ratos adultos que sofreram SE durante estágios iniciais da vida.

PARTE V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agertt, F., Antoniuk, S. A., Bruck, I. and dos Santos, L. C. "Tratamento do estado de mal epiléptico em pediatria: revisão e proposta de protocolo." Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology **11**: 183-188 (2005).

Aicardi, J. and Chevrie, J. J. "Convulsive status epilepticus in infants and children. A study of 239 cases." Epilepsia **11**: 187-197 (1970).

Aicardi, J. and Chevrie, J. J. "Status epilepticus." Pediatrics **84**: 939-940 (1989).

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S. and Mizuno, N. "Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats." J Comp Neurol **347**: 150-160 (1994).

Appleton, R., Choonara, I., Martland, T., Phillips, B., Scott, R. and Whitehouse, W. "The treatment of convulsive status epilepticus in children. The Status Epilepticus Working Party, Members of the Status Epilepticus Working Party." Arch Dis Child **83**: 415-419 (2000).

Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. and Feldon, J. "Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety." Neurosci. Biobehav. Rev. **28**: 273-283 (2004).

Barnard, C. and Wirrell, E. "Does status epilepticus in children cause developmental deterioration and exacerbation of epilepsy?" J Child Neurol **14**: 787-794 (1999).

Bear, M. F., Connors, B. W. and Paradiso, M. A. (2002). Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre, ARTMED: 855.

Bear, M. F., Connors, B. W. and Paradiso, M. A. (2009). Neuroscience: exploring the brain. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Bender, R. A., Dube, C., Gonzalez-Vega, R., Mina, E. W. and Baram, T. Z. "Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures." Hippocampus **13**: 399-412 (2003).

Berne, R. M. and Levy, M. N. (2000). Fisiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1034.

Bigge, C. F. "Structural requirements for the development of potent N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonists." Biochem Pharmacol **45**: 1547-1561 (1993).

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A. and Zhang, D. "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits." Nature **415**: 793-798 (2002).

Chen, K., Aradi, I., Thon, N., Eghbal-Ahmadi, M., Baram, T. Z. and Soltesz, I. "Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability." Nat Med **7**: 331-337 (2001).

- Clifford, D. B., Olney, J. W., Benz, A. M., Fuller, T. A. and Zorumski, C. F. "Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage." Epilepsia **31**: 382-390 (1990).
- Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C. and Zorumski, C. F. "The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures." Neuroscience **23**: 953-968 (1987).
- Cotman, C. W., Monaghan, D. T. and Ganong, A. H. "Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **11**: 61-80 (1988).
- Cull-Candy, S., Brickley, S. and Farrant, M. "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol **11**: 327-335 (2001).
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. and Avoli, M. "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci Methods **172**: 143-157 (2008).
- da Silva, F. C., do Carmo de Oliveira Cito, M., da Silva, M. I., Moura, B. A., de Aquino Neto, M. R., Feitosa, M. L., de Castro Chaves, R., Macedo, D. S., de Vasconcelos, S. M., de Franca Fonteles, M. M. and de Sousa, F. C. "Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice." Brain Res. Bull. **83**: 9-15 (2010).
- de Oliveira, D. L., Fischer, A., Jorge, R. S., da Silva, M. C., Leite, M., Goncalves, C. A., Quillfeldt, J. A., Souza, D. O., e Souza, T. M. and Wofchuk, S. "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 **49**: 842-852 (2008).
- de Oliveira, D. L., Horn, J. F., Rodrigues, J. M., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O. and Wofchuk, S. "Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine." Brain Res **1018**: 48-54 (2004).
- Di Maio, R., Mastroberardino, P. G., Hu, X., Montero, L. and Greenamyre, J. T. "Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms." Neurobiol Dis (2011).
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**: 7-61 (1999).
- Druga, R., Mares, P. and Kubova, H. "Time course of neuronal damage in the hippocampus following lithium-pilocarpine status epilepticus in 12-day-old rats." Brain Res **1355**: 174-179 (2010).
- Dube, C., Chen, K., Eghbal-Ahmadi, M., Brunson, K., Soltesz, I. and Baram, T. Z. "Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term." Ann. Neurol. **47**: 336-344 (2000).

- Elger, C. E. and Schmidt, D. "Modern management of epilepsy: a practical approach." Epilepsy Behav **12**: 501-539 (2008).
- Engel, J., Jr. "Intractable epilepsy: definition and neurobiology." Epilepsia **42 Suppl 6**: 3 (2001a).
- 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 **42**: 796-803 (2001b).
- Engel, J. J., Williamson, P. D. and Wieser, H. G. (1997). Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. In Epilepsy: a comprehensive textbook. E. J. Jr. and P. T. A. Philadelphia, Lippincott-Raven. **1**.
- Fabene, P. F., Merigo, F., Galie, M., Benati, D., Bernardi, P., Farace, P., Nicolato, E., Marzola, P. and Sbarbati, A. "Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms." PLoS One **2**: e1105 (2007).
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Gonzalez-Castaneda, R. E. and Beas-Zarate, C. "[Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]." Neurologia **27**: 301-310 (2012).
- Fonnum, F. "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." J Neurochem **42**: 1-11 (1984).
- Fujikawa, D. G. "Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset." Epilepsia **36**: 186-195 (1995).
- Haas, K. Z., Sperber, E. F., Opanashuk, L. A., Stanton, P. K. and Moshe, S. L. "Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling." Hippocampus **11**: 615-625 (2001).
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. and Bading, H. "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**: 405-414 (2002).
- Henneberger, C., Bard, L., King, C., Jennings, A. and Rusakov, D. A. "NMDA Receptor Activation: Two Targets for Two Co-Agonists." Neurochem Res (2013).
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I. and Philpot, B. D. "Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions." Prog Neurobiol **91**: 23-37 (2010).
- Hirsch, E., Baram, T. Z. and Snead, O. C., 3rd "Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats." Brain Res **583**: 120-126 (1992).
- Hoffmann, A. F., Zhao, Q. and Holmes, G. L. "Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis"." Epilepsy Behav **5**: 873-877 (2004).
- Holmes, G. L. "Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity." Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. **10**: 101-105 (2004).

- Holopainen, I. E. "Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization." Neurochem Int **52**: 935-947 (2008).
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L. and Olney, J. W. "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain." Science **283**: 70-74 (1999).
- Izquierdo, I. and Medina, J. H. "Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures." Neurobiol Learn Mem **68**: 285-316 (1997).
- Johnson, J. W. and Ascher, P. "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." Nature **325**: 529-531 (1987).
- Jones, D. M., Esmail, N., Maren, S. and Macdonald, R. L. "Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus." Epilepsy Res **50**: 301-312 (2002).
- Kaindl, A. M. and Ikonomidou, C. "Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain." Neurotox Res **11**: 203-218 (2007).
- Kapur, J. and Macdonald, R. L. "Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABA_A receptors." J Neurosci **17**: 7532-7540 (1997).
- Kemp, J. A. and Leeson, P. D. "The glycine site of the NMDA receptor--five years on." Trends Pharmacol Sci **14**: 20-25 (1993).
- Kemp, J. A. and McKernan, R. M. "NMDA receptor pathways as drug targets." Nat Neurosci **5 Suppl**: 1039-1042 (2002).
- Kubova, H., Druga, R., Lukasiuk, K., Suchomelova, L., Haugvicova, R., Jirmanova, I. and Pitkanen, A. "Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats." J Neurosci **21**: 3593-3599 (2001).
- Kubova, H., Mares, P., Suchomelova, L., Brozek, G., Druga, R. and Pitkanen, A. "Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis." Eur J Neurosci **19**: 3255-3265 (2004).
- Kwong, K. L., Chang, K. and Lam, S. Y. "Features predicting adverse outcomes of status epilepticus in childhood." Hong Kong Med J **10**: 156-159 (2004).
- Leite, J. P., Garcia-Cairasco, N. and Cavalheiro, E. A. "New insights from the use of pilocarpine and kainate models." Epilepsy Res **50**: 93-103 (2002).
- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H. and Raymond, L. A. "Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors." Nat Neurosci **5**: 833-834 (2002).

- Lothman, E. "The biochemical basis and pathophysiology of status epilepticus." Neurology **40**: 13-23 (1990).
- Mathern, G. W., Adelson, P. D., Cahan, L. D. and Leite, J. P. "Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited." Prog Brain Res **135**: 237-251 (2002).
- Mathern, G. W., Pretorius, J. K. and Babb, T. L. "Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures." J Neurosurg **82**: 220-227 (1995).
- McDonald, J. W. and Johnston, M. V. "Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development." Brain Res Brain Res Rev **15**: 41-70 (1990).
- McDonough, J. H., Jr. and Shih, T. M. "Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology." Neurosci Biobehav Rev **21**: 559-579 (1997).
- McNamara, J. O. "Cellular and molecular basis of epilepsy." J Neurosci **14**: 3413-3425 (1994).
- Melo, A. N., Nunes, M. L. and Yacubian, E. M. T. (2006). Crises epilépticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas. São Paulo, Segmento Farma: 92.
- Meyer, A., Falconer, M. A. and Beck, E. "Pathological findings in temporal lobe epilepsy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **17**: 276-285 (1954).
- Michelson-Kerman, M., Waternberg, N., Nissenkorn, A., Gilad, E., Sadeh, M. and Lerman-Sagie, T. "Muscle glycogen depletion and increased oxidative phosphorylation following status epilepticus." J Child Neurol **18**: 876-878 (2003).
- Monaghan, D. T. and Cotman, C. W. "Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain." J Neurosci **5**: 2909-2919 (1985).
- Monaghan, D. T. and Jane, D. E. "Pharmacology of NMDA Receptors." (2009).
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**: 529-540 (1994).
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A. and Snyder, S. H. "D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 4926-4931 (2000).
- Nairismagi, J., Pitkanen, A., Kettunen, M. I., Kauppinen, R. A. and Kubova, H. "Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study." Epilepsia **47**: 479-488 (2006).

- Nedergaard, M., Takano, T. and Hansen, A. J. "Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter." Nat Rev Neurosci **3**: 748-755 (2002).
- Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G. and Knöpfel, T. "Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders?" Trends Neurosci **19**: 267-271 (1996).
- Ogden, K. K. and Traynelis, S. F. "New advances in NMDA receptor pharmacology." Trends Pharmacol Sci **32**: 726-733 (2011).
- Olney, J. W. "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." Science **164**: 719-721 (1969).
- Olney, J. W., Labruyere, J. and Price, M. T. "Pathological changes induced in cerebocortical neurons by phencyclidine and related drugs." Science **244**: 1360-1362 (1989).
- Ozawa, S., Kamiya, H. and Tsuzuki, K. "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." Prog Neurobiol **54**: 581-618 (1998).
- Paoletti, P. "Molecular basis of NMDA receptor functional diversity." Eur J Neurosci **33**: 1351-1365 (2011).
- Petralia, R. S. "Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons." ScientificWorldJournal **2012**: 267120 (2012).
- Prybylowski, K. and Wenthold, R. J. "N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse." J Biol Chem **279**: 9673-9676 (2004).
- Raspall-Chaure, M., Chin, R. F., Neville, B. G. and Scott, R. C. "Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review." Lancet Neurol **5**: 769-779 (2006).
- Riedel, G., Platt, B. and Micheau, J. "Glutamate receptor function in learning and memory." Behav Brain Res **140**: 1-47 (2003).
- Rosenow, F., Hamer, H. M. and Knake, S. "The epidemiology of convulsive and nonconvulsive status epilepticus." Epilepsia **48 Suppl 8**: 82-84 (2007).
- Sankar, R. and Rho, J. M. "Do seizures affect the developing brain? Lessons from the laboratory." J Child Neurol **22**: 21S-29S (2007).
- Sankar, R., Shin, D. H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Wasterlain, C. G. "Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences." J Neurosci **18**: 8382-8393 (1998).
- Sayin, U., Sutula, T. P. and Stafstrom, C. E. "Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety." Epilepsia **45**: 1539-1548 (2004).

Schell, M. J., Molliver, M. E. and Snyder, S. H. "D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 3948-3952 (1995).

Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J. and Sonnewald, U. "Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites." Glia **21**: 99-105 (1997).

Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A. and Mora, F. "Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective." Mech Ageing Dev **122**: 1-29 (2001).

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. "Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex." Nature **368**: 144-147 (1994).

Sinner, B. and Graf, B. M. "Ketamine." Handb Exp Pharmacol 313-333 (2008).

Sirven, J. I. and Waterhouse, E. "Management of status epilepticus." Am Fam Physician **68**: 469-476 (2003).

Slikker, W., Jr., Zou, X., Hotchkiss, C. E., Divine, R. L., Sadovova, N., Twaddle, N. C., Doerge, D. R., Scallet, A. C., Patterson, T. A., Hanig, J. P., Paule, M. G. and Wang, C. "Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey." Toxicol Sci **98**: 145-158 (2007).

Spooren, W., Ballard, T., Gasparini, F., Amalric, M., Mutel, V. and Schreiber, R. "Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders." Behav Pharmacol **14**: 257-277 (2003).

Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. "A family of metabotropic glutamate receptors." Neuron **8**: 169-179 (1992).

Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z. and Turski, L. "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study." Behav Brain Res **9**: 315-335 (1983).

van Esch, A., Ramlal, I. R., van Steensel-Moll, H. A., Steyerberg, E. W. and Derksen-Lubsen, G. "Outcome after febrile status epilepticus." Dev. Med. Child. Neurol. **38**: 19-24 (1996).

VanLandingham, K. E., Heinz, E. R., Cavazos, J. E. and Lewis, D. V. "Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions." Ann Neurol **43**: 413-426 (1998).

Vutskits, L., Gascon, E., Tassonyi, E. and Kiss, J. Z. "Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro." Toxicol Sci **91**: 540-549 (2006).

Walton, N. Y. and Treiman, D. M. "Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam." Exp Neurol **101**: 267-275 (1988).

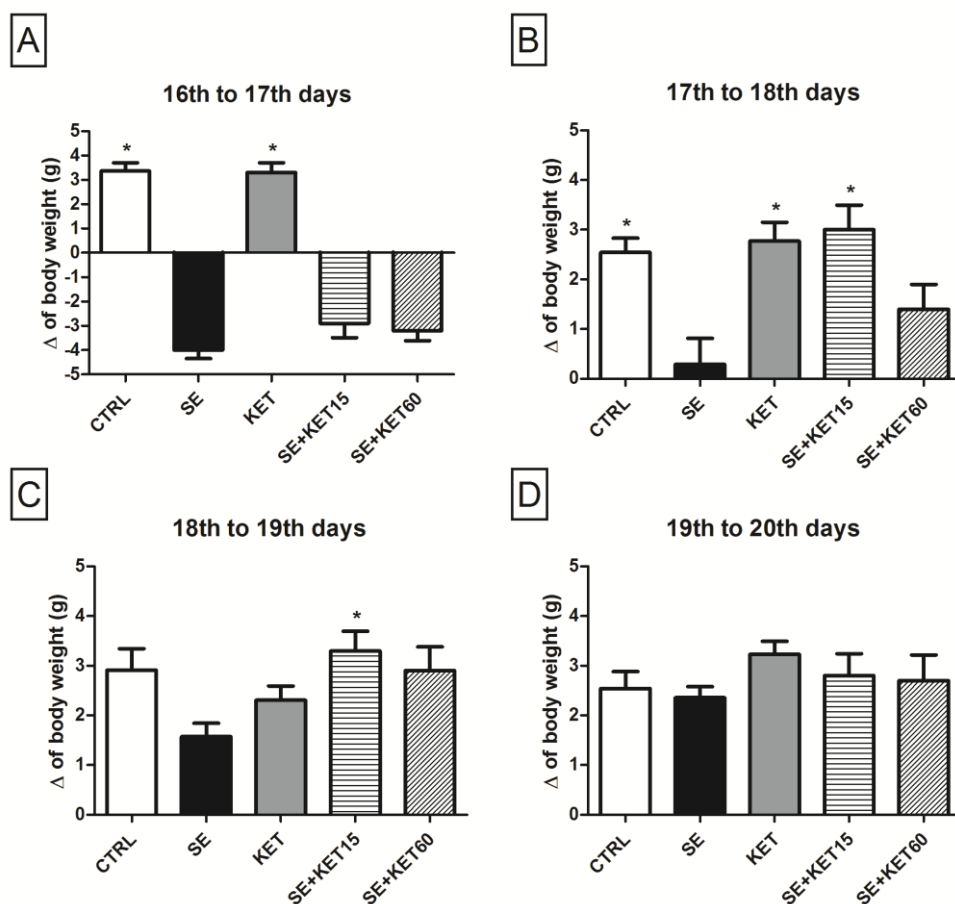
Wang, L., Liu, Y. H., Huang, Y. G. and Chen, L. W. "Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining." Brain Res **1241**: 157-167 (2008).

Watkins, J. C. and Jane, D. E. "The glutamate story." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S100-108 (2006).

ANEXO I

CAPÍTULO I - KETAMINE REDUCES NEURONAL DEGENERATION AND ANXIETY LEVELS WHEN ADMINISTERED DURING EARLY LIFE-INDUCED STATUS EPILEPTICUS IN RATS

Figura suplementar 1. Dados não publicados.



Supplementary Fig. S1. Body weight variation. After SE induction, body weight was assessed daily until the weaning. Change in body weight between (A) 16th and 17th days, (B) 17th and 18th days, (C) 18th and 19th days and (D) 19th and 20th days. Animals presented the same weight gain in 21st day when compared to 20th (data not shown). N = 10-14 animals/group. * = P < 0.05 as compared to SE group. All data were analyzed by one-Way ANOVA followed by Tukey post hoc test.