

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

EFEITOS DA DEXAMETASONA EM PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONVULSÃO
INDUZIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO

VICTOR HERMES CERESÉR JÚNIOR

Orientador

Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

**Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado a força necessária, não só durante esse curso, mas durante toda a minha vida. Agradeço também a minha família por ter me apoiado durante esse tempo. Ao meu orientador, o Diogo. Aos professores Luís Valmor Portela, Professora Lisiane Porciúncula. Aos colegas, por terem me ajudado e me apoiado.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
Introdução	4
Objetivos	15
Materiais, métodos e resultados	16
Discussão	39
Conclusão	42
Referências bibliográficas	43

Parte I

Resumo

A convulsão é um evento em que os neurônios sofrem descargas elétricas excessivas e anormais e pode estar envolvido com uma excessiva atividade glutamatérgica. Embora existam controversas na literatura sobre os efeitos dos glicocorticóides no metabolismo glutamatérgico, o efeito anticonvulsivante dessas drogas é conhecido há décadas. Esse trabalho investigou os efeitos da dexametasona (um glicocorticóide) em camundongos submetidos a um modelo de convulsão induzida pelo ácido quinolínico em parâmetros tais como a latência e a duração das convulsões bem como na captação cerebral de glutamato. A dexametasona preveniu a convulsão em 48% dos animais e diminuiu o tempo de duração das convulsões. Além disso, a dexametasona reverteu a baixa captação de glutamato causada pela convulsão induzida pelo ácido quinolínico, tanto nos animais protegidos (que não convulsionaram) como nos animais que sofreram convulsão. Esses resultados indicam que a dexametasona é um fármaco anticonvulsivante contra a hiper-estimulação do sistema glutamatérgico e que o envolvimento desse sistema em convulsões necessita ser melhor estudado.

Abstract

Seizure episode is an event where the neurons undergo excessive and abnormal electric discharge and may involve an excessive brain glutamatergic activity. Although there are some controversial in the literature about the glucocorticoids effects on glutamate activity, these drugs have been used for decades to treat seizures. This work investigated the effect of dexamethasone on seizures induced by i.c.v. administration of quinolinic acid (that causes overstimulation of the glutamatergic system) on parameters such time latency and duration of seizures, as well as on brain glutamate uptake. Dexamethasone prevented seizures in 48% mice and decreased the time duration of seizures. Furthermore, dexamethasone reverted the decrease of glutamate uptake caused by quinolinic acid-induced seizures, both in mice presenting (not protected) or not (protected) seizures. These results indicate that dexamethasone is an anticonvulsant drug against overstimulation of the glutamatergic system and that the glutamatergic system parameters involved in these actions need further investigations.

ABREVIATURAS

A.Q.	Ácido Quinolínico
EAAC	Excitatory amino acid carrier
EAAT	Excitatory amino acid transporter
GC	Glicocorticóide
GLT	L-glutamate transporter
GTP	Guanosina trifosfato
NMDA	N- metil-D-aspartato
SNC	Sistema nervoso central

Introdução

Histórico

O mais velho relato detalhado de epilepsia está contido em um manuscrito que é um capítulo de um livro texto babilônico de medicina que resume 40 manuscritos datados por volta de 2000 a.C. Este documento registra com detalhes diferentes tipos de ataques epiléticos, enfatiza a natureza sobrenatural da epilepsia com cada tipo de ataque, associado com o nome de um espírito ou deus, normalmente do mal. Em cerca de 1700 a. C., no Egito, o principal documento de neurologia, o Papiro Smith, cita possíveis crises convulsivas. Na Suméria, por volta da mesma época, vários textos registram muito bem as crises epiléticas (Moreira, 2004).

Todas as idéias relacionadas a doenças vinculavam ao sobrenatural. Hipócrates, pai da medicina, foi o primeiro a desvincular a epilepsia do sobrenatural, mencionando que o foco desse distúrbio estava no cérebro, com suspeitas de que o distúrbio era hereditário (Moreira, 2004). Os escritos da época foram os primeiros a atribuir causas físicas às doenças neurológicas e identificaram o cérebro como a chave para o entendimento do comportamento humano.

A Bíblia também cita os distúrbios epiléticos em Mateus 17:14-18, Marcos 9:17-27 e Lucas 9:38-42, relata-se o caso de um jovem epilético levado a Jesus em busca de cura.

Diversos pesquisadores antigos investigaram a epilepsia. Os destaques foram Areteus na Capadócia, Galeno de Pergamo (juntamente com Hipócrates, a maior autoridade médica da idade antiga) e Celso Aureliano. Na Alexandria,

Erasistrato e Herófilo fizeram dissecações humanas para o estudo dessa doença.

Na idade média a epilepsia era tida como uma doença mental contagiosa.

Na renascença, com a revolução científica, a anatomia humana começou a ser realmente estudada. O livro de anatomia "De Humanis Corpora Fabrica", de Andréa de Vesalius, concluído em 1543, é uma das obras mais importantes da história da Medicina. René Descartes fez muitos estudos anatômicos e fisiológicos com animais.

No século XVIII, surgiram conceitos opostos às explicações sobrenaturais para a epilepsia, que vinham perseverando através dos séculos, não sendo suficientemente fortes para a mudança de concepções, dado o grande estigma ligado à possessão e à evidência da lua, que ainda influenciava corpos humanos com doenças por ela produzidas (Moreira, 2004).

O século XIX foi caracterizado por grandes avanços nas ciências biológicas. Os estudos eminentes no campo da filosofia e da neurofisiologia foram consolidados, repercutindo nos estudos das patologias cerebrais. Entre autores de relevância no século XIX, que se destacaram pelas investigações da epilepsia, está o autor inglês Hughlings Jackson (1835-1911). Jackson mencionou que essa doença é causada por uma descarga anormal das células nervosas. Embora o crescimento dos hospitais psiquiátricos nesse século tenha sido considerável, muitos fechavam as suas portas aos pacientes epiléticos, tal era o estigma em relação aos portadores dessa doença. Outros nomes que foram importantes no estudo da epilepsia são os seguintes: (Pinel, 1745-1826; Esquiroll, 1772-1840; Morel, 1809-1879; Lombroso, 1836-1909, entre outros) (Moreira, 2004).

Seguem abaixo alguns conceitos de epilepsia do século XX:

“A epilepsia é um quadro clínico produzido por uma descarga elétrica súbita, anormal e desordenada dos neurônios. Essas descargas podem compreender uma, várias ou todas as categorias e níveis do sistema nervoso, . assim fala de descargas psíquicas, descargas motoras, descargas sensitivas, descargas sensoriais e descargas neurovegetativas, todas as quais são expressão de epilepsia como conceito patogênico e constituem clinicamente as epilepsias.” Gareiso & Escardó (1949)

“Uma desordem crônica do cérebro por várias etiologias, caracterizada por crises recorrentes devido à descarga de neurônios cerebrais [...]. Crises epilépticas isoladas ou ocasionais, ocorrendo em doenças agudas, não devem ser classificadas como epilepsia.” Gastaut (1973)

As seguintes personalidades históricas são suspeitos portadores de epilepsia:

Francesco Petrarch, Charles Dickens, Molière, Blaise Pascal, Nicolo Paganini, Lord Byron, Feodor Mykhailovich Dostoievsky, Gustave Flaubert, Algernon Charles Gogh, Alfred Nobel, William Morris, Pitágoras, Empedocies, Sócrates, Torquato Tasso, Isaac Newton, Jonathan Swift, Sir Walter Scott, Dante, Emmanuel Swedenborg, George Frederick Handel, Peter Ilich Tchaikovsky, Robert Schumann, Ludwig van Beethoven, Samuel Johnson, Leo Tolstoy, Guy de Maupassant, Percy Bysshe Shelley, Truman Capote e Michael Wilding.

Conceito de epilepsia

Atualmente, a epilepsia tem sido descrita mais como uma síndrome do que como uma doença. Dentro desse conceito, podem-se citar autores de relevância como Guerreiro (1993), que diz ser a epilepsia uma condição crônica, ou um grupo de doenças que têm em comum crises epiléticas que ocorrem na ausência de doença toxicometabólica ou febril (Moreira, 2004). Por tratar-se de um distúrbio cerebral em que ocorrem crises epiléticas o seu diagnóstico pode ser feito após duas ou mais crises convulsivas não provocadas. Geralmente, após uma crise convulsiva não provocada, o indivíduo tem 40 a 50% de ter uma reincidência. Após uma segunda crise convulsiva não provocada, a chance de reincidência é em torno de 80%. Crise convulsiva é um fenômeno em que as células nervosas sofrem descargas excessivas e anormais (Canfield and Canfield, 2006).

Prevalência

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia. A incidência anual varia de 30 a 50 novos casos em cada 100 mil indivíduos. A epilepsia é considerada a segunda causa mais freqüente de distúrbio neurológico em adultos jovens (Kwan and Brodie, 2000). É um distúrbio que acomete indivíduos de todas as idades, raças e classes socioeconômicas (Betting et al, 2003).

Causas

As causas de epilepsia podem ser lesões cerebrais oriundas de traumatismos, tumores, distúrbios cerebrais degenerativas, infecções, abuso de drogas e complicações durante o parto. Enfim, por qualquer condição que afete o córtex cerebral (Rigatti e *Trevisol-Bittencourt*, 1999).

Formas de tratamento

A principal forma de tratamento é a terapia medicamentosa, as principais drogas usadas são carbamazepina, clobazam, oxcarbezina, fenitoína, ácido valpróico, topiramato e lamotrigina (Canfield and Canfield, 2006). Entretanto, para os casos mais graves em que os pacientes não respondem a nenhum dos fármacos disponíveis no mercado, denominados pacientes refratários, algumas opções são a remoção cirúrgica do foco epiléptico no cérebro, estimulação vagal ou a dieta cetogênica (Kalapos, 2006), que devem ser feitas com o acompanhamento de um profissional.

Conceito de glicocorticóides

Os glicocorticóides são hormônios que mimetizam a ação do cortisol endógeno, hormônio secretado pela zona glomerular das supra-renais. Essas substâncias têm ação principalmente sobre o metabolismo glicídico. Para aumentar a potência antiinflamatória e diminuir a potência retentora de sódio, característica da aldosterona, outro hormônio do córtex adrenal, modificações químicas são feitas na sua estrutura. A pesquisa com modificações estruturais gerou um grande número de fármacos com distintas potências, alguns atributos especiais e amplo uso terapêutico (Wannacher e Ferreira,1998).

Principais usos dos glicocorticóides

Os glicocorticóides são amplamente empregados como antiinflamatórios. Dentre as principais aplicações desse grupo de medicamentos encontram-se o tratamento de exarcebações agudas de Lupus eritematoso, polimiosite e dermatomiosite, artite reumatóide, sarcoidose, asma, nefropatia membranosa idiopática, glomerulonefrite membranosa-proliferativa, anemia hemolítica auto-imune, púrpura trombocitopênica idiopática, colite ulcerativa refratária a outros tratamentos, doenças alérgicas entre outros usos (Wannacher e Ferreira,1998).

Mecanismo de ação

Os principais mecanismos de ação mais amplamente descritos para a ação desses medicamentos são os seguintes:

- os glicocorticóides se ligam aos seus receptores de membrana, o complexo droga - receptor sofre endocitose, migrando até o núcleo da célula onde se ligará a seqüências de DNA chamadas de elementos de resposta a

glicocorticóides. A partir da formação deste complexo ocorre o recrutamento de proteínas que modificam a estrutura da cromatina, facilitando ou inibindo a transcrição de proteínas (Hebbar and Archer, 2003).

- o segundo mecanismo consiste da interação entre o complexo glicocorticoide e o seu receptor com fatores de transcrição, tais como o fator nuclear $\kappa \beta$ (McKay and Cidlowski, 1999; De Bosscher, Vanden Berghe and Haegeman, 2003).

- o terceiro mecanismo consiste na interação de proteínas associadas a receptores de membrana e segundos mensageiros, sendo essa uma via de sinalização não genômica (Hafezi-Moghadam, Simoncini and Yang, 2002; Cato, Nestl and Mink 2002).

Além desses mecanismos principais citados anteriormente, os glicocorticóides podem ainda interagir diretamente nas membranas celulares, alterando a condução de íons (Wolkowitz and Réus, 1999).

Sintomas psiquiátricos durante a terapia com glicocorticóides

A administração de glicocorticóides em pacientes com função supra-renal normal produz uma leve elevação do humor, euforia, irritabilidade, aumento da atividade motora, insônia e em alguns casos, psicose (Murphy, 1991; Wada et al, 2001). Para muitos autores, o uso agudo está associado a sintomas maníacos e de psicose, enquanto que os sintomas depressivos parecem estar mais associados a usos crônicos (Wada et al, 2001; Patten SB, Neutel, 2000).

Glicocorticóides no tratamento da epilepsia

O tratamento para a epilepsia pode ser uma tarefa árdua e frustrante. Cerca de 25% dos pacientes epiléticos são refratários aos anti-epiléticos clássicos, e mesmo a remoção do foco epilético pode não garantir diminuição na frequência das crises. Os glicocorticóides têm sido utilizados para tratar convulsões há décadas (Aird and Woodbury, 1975), sendo efetivos no tratamento de espasmos infantis, na síndrome de Lennox-Gesaut (Snead, Benton and Myers, 1983), uma encefalopatia intratável com crises epiléticas, e na prevenção da atividade epilética (Pieretti et al, 1992). Estudos prévios demonstraram que a dexametasona tem um efeito inibitório sobre a atividade epilética da criaria lactona e do pentilenotetrazol (Zhu, Wey and Ma, 1999), mas o mecanismo pelo qual ocorre esse efeito é desconhecido. Dentro deste contexto tem-se investigado a influência da administração de dexametasona sobre o sistema glutamatérgico.

Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos. Esse aminoácido participa de funções importantes no sistema nervoso central tais como o processo de memória e aprendizado (Izquierdo, 2006) bem como na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Ozawa et al., 1998). O glutamato exerce a sua neurotransmissão por meio da ativação de receptores ionotrópicos (canais permeáveis a íons) e receptores metabotrópicos (acoplados às proteínas G), que estão presentes nas membranas pré e pós sinápticas e também presentes nas membranas das células gliais (Ozawa et al., 1998). Após exercer os seus efeitos excitatórios o glutamato precisa ser removido da fenda sináptica por sistemas de transporte presentes nas membranas das células gliais e neuronais. Esses sistemas possuem diferentes afinidades pelo glutamato e garantem que esse aminoácido não permaneça na fenda sináptica por um período prolongado após exercer a sua sinalização. Os transportadores de glutamato são divididos de acordo com a sua localização no sistema nervoso central em GLAST e GLT-1, presentes predominantemente nas membranas das células gliais, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 presente nas membranas dos neurônios, EAAT4 (expresso nos dendritos das células de Purkinje no cerebelo) e o EAAT5 (expresso na retina) (Galvan, Kuwajima And Smith. 2006).

Atualmente com os avanços das técnicas moleculares em que se tornou possível a deleção de um gene específico, foi possível demonstrar a importância dos transportadores glutamatérgicos na manutenção da homeostase do sistema nervoso central. De fato, a deleção genética de alguns transportadores de glutamato revelou que particularmente a ausência dos

transportadores astrocitários aumenta os níveis extracelulares de glutamato provocando convulsões, neurotoxicidade e morte dos animais (Rothstein et al., 1996). O transportador neuronal não parece estar intimamente envolvido com as convulsões e com o aumento extracelular de glutamato, mas com a manutenção dos níveis intracelulares de glutamato a partir da captação de cisteína (Aoyama et al., 2006).

A análise *in vitro* de fatias cerebrais na presença de inibidores dos transportadores de glutamato revelam registros de atividade epileptiforme (Milh et al., 2007, Campbell e Hablitz, 2005), reforçando mais uma vez a idéia de que o comprometimento do sistemas de transporte de glutamato podem desencadear o surgimento das convulsões. Por outro lado, evidências do nosso grupo correlacionaram o efeito anticonvulsivante do nucleosídeo guanosina com um aumento na captação de glutamato, sugerindo que compostos que aumentem o transporte de glutamato podem apresentar atividade anticonvulsivante (Losh et al, 2004).

Os glicocorticóides sofrem influência da sinalização pelo glutamato, pois antagonistas glutamatérgicos parecem acentuar a toxicidade de altas concentrações de dexametasona (Danilczuk et al., 2006). Por outro lado, estudos *in vitro* com culturas de neurônios granulares de cerebelo demonstraram que o antagonismo de receptores NMDA previne a morte celular pela dexametasona (Jacobs et al., 2006). No que diz respeito aos transportadores de glutamato, particularmente o GLT-1 aumenta sua expressão no hipocampo de animais submetidos cronicamente ao estresse por imobilização, modelo experimental em que se observa aumento nos níveis circulantes de glicocorticóides (Autry et al., 2006). Além disso, o glutamato

parece influenciar a liberação do fator de liberação da corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bran, 2005; Hrabovszky et al, 2004). Um estudo recente com glicocorticóide mostrou que esse composto suprimiu a liberação de glutamato pela ativação de um receptor de membrana de GC (Di et al, 2005). Entretanto, estudos mais detalhados correlacionando o efeito anticonvulsivante dos glicocorticóides com a captação de glutamato ainda não foram realizados.

Objetivos

Uma vez que os efeitos da dexametasona no metabolismo glutamatérgico são controversos e que esse fármaco tem sido descrito como possuidor de uma atividade anticonvulsivante, os objetivos desse trabalho são investigar os efeitos da dexametasona na convulsão induzida por ácido quinolínico bem como os efeitos desse fármaco na captação de glutamato quando o animal é submetido a esse modelo de convulsão.

Parte II - Materiais, Métodos e Resultados

Os matérias, métodos e resultados serão apresentados na forma de artigo científico a ser submetido na revista internacional “Neurochemical Research”.

Dexamethasone Prevents The Decrease of Glutamate Uptake Caused By Quinolinic Acid-induced seizures.

Victor Ceresér Júnior¹, Marcelo Ganzella¹, André Schmidt¹, Lúcia Martini¹, Júlia Dubois, Luiza Knor¹, Luís Valmor Portela¹, Diogo Onofre Souza¹.

¹Departamento of Biochemistry. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

²Address reprint requests to: Mr. Diogo O. Souza, Avenida Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre-Rs-Brazil. Tel.: +55-51-3316-5535, Fax: +55-51-3308-5540/55-51-3308-5535; E-mail: diogo@ufrgs.br

Abstract

Seizure episode is an event where the neurons undergo excessive and abnormal electric discharge and may involve an excessive brain glutamatergic activity. Although there are some controversial in the literature about the glucocorticoids effects on glutamate activity, these drugs have been used for decades to treat seizures. This work investigated the effect of dexamethasone on seizures induced by i.c.v. administration of quinolinic acid (that causes overstimulation of the glutamatergic system) on parameters such time latency and duration of seizures, as well as on brain glutamate uptake. Dexamethasone prevented seizures in 48% mice and decreased the time duration of seizures. Furthermore, dexamethasone reverted the decrease of glutamate uptake caused by quinolinic acid-induced seizures, both in mice presenting (not protected) or not (protected) seizures. These results indicate that dexamethasone is an anticonvulsant drug against overstimulation of the glutamatergic system and that the glutamatergic system parameters involved in these actions need further investigations.

Key words: Dexamethasone; Glucocorticoids; Glutamate Uptake; Quinolinic;

Acid; Seizure; Convulsion; Eepilepsy; Brain; Effects;

Introduction

Related to seizure episode the neurons undergo excessive and abnormal electric discharge. A seizure may present various manifestations, as motors psychic, sensorial or neurovegetative events. Seizures may be classified in simple partial seizure (where not occurs conscience alterations), complex partial seizure (where occurs conscience alterations) and generalized seizure (that is bilateral and involves ample areas of the brain) (1).

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the brain, and its interactions with specific membrane receptors are responsible for essential brain processes (2) such as development and aging (3), and memory (4). Glutamate acts via ionotropic (glutamate-gated ions channels) and metabotropic (a GTP-binding protein linked) (5, 6, 1) receptors. The glutamate actions are terminated by its removal from synaptic cleft mainly by astrocytes through a high affinity sodium dependent glutamate uptake system (7, 8, 9). However, when present at excessive levels in the synaptic cleft, glutamate acts as an excitotoxin, by overstimulating glutamatergic receptors (10, 11, 12). If seizures involve excessive glutamatergic activity, compounds that decrease the extracellular glutamate levels in the synaptic cleft are potentially anticonvulsant.

Accordingly, our group found that guanosine, which stimulates the astrocytic glutamate uptake, has anticonvulsive activity (13,14, 15, 16, 17).

Glucocorticoids have been used to treat seizures for decades (18). They are effective in the treatment of infantile spasm and Lennox-Gsataut syndromes (19), an untreatable encephalopathy that presents convulsions, and in prevention of epileptiform activity (20). But its mechanism of anti-seizure is unknown. Glucocorticoids have controversial effects in glutamate activity (21). Glucocorticoid receptors interact with NMDA glutamatergic receptors, leading to a sustained calcium influx, resulting in prolonged calcium cytosolic elevation and causing disturbance in calcium homeostasis (22), leading to production of free radicals, degradation of intracellular structures and mitochondrial damage (23). However, a recent study shows that glucocorticoids could suppress glutamate release by activating a putative membrane glucocorticoid receptor (24).

The aim of this work was to investigate the anticonvulsant effect of the glucocorticoid dexamethasone in adult male mice submitted to quinolinic acid (QA)-induced seizures and to investigate the role of brain glutamate uptake in its anticonvulsant action.

Material and Methods

Materials

Dexamethasone was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The anesthetic sodium thiopental was obtained from Cristália (Itapira, SP, Brazil).

Animals

Male adult albino CF1 mice were kept on a 12- h light/ dark cycle at a constant temperature of $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Animals were housed for 2 weeks in plastic cages with water and food available ad libitum. Institutional protocols for experiments with animals were designed to minimize suffering and limit the number of animals killed.

Surgical procedure

Surgery and i.c.v infusion were adapted from Haley and Mc Comick (25). Animals were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/ Kg). In a stereotaxic apparatus the skin of the skull was detached, and an i.c.v. guide cannula for infusion was implanted. Stereotaxic coordinates were 1 mm posterior to bregma, 1 mm right of the midline, and 1 mm to lateral brain ventricle. The guide cannula was implanted 1.5 mm ventral to the superior surface of the skull and fixed with jeweler's acrylic cement.

Experiments were performed 48 h after surgery. i.c.v. treatments were performed with a 30-gauged cannula, which was fitted into the guide cannula and connected by a polyethylene tube to a micro syringe. The tip of infusion cannula protruded 1 mm beyond the guide cannula (8 mm), aiming the lateral brain ventricle.

Treatment

Mice were divided in 4 groups: 1. Vehicle/vehicle; 2. Vehicle/QA; 3a. Dexamethasone/QA (presenting seizures); 3b. Dexamethasone/QA (no seizures). They received i.p. vehicle (corn oil) or dexamethasone (5 mg/kg). After 30 min, the animals received 4 uL (i.c.v.) of 9,2 mM quinolinic acid (QA) or saline solution (0,9%) and animals were kept in a Plexiglas chambers for observation of convulsive behavior. The time of onset of the first seizure was defined as the time from the end of the i.c.v. injection to the appearance of seizures. The latency of first seizure and convulsive behavior duration were observed for 10 minutes. Animals not displaying seizures during these 10 minutes were considered protected.

Glutamate uptake

Mice were decapitated 10 min after i.c.v. administration, and brains were immediately removed and humidified with Hank's balanced salt solutions (HBSS-pH

7,4) containing (in mM): 137 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ and 5.55 glucose. Slices (400 μm) from cortices (parietal area) and hippocampi were obtained using a McIlwain tissue chopper. Glutamate uptake was performed at 35° C (14, 26, 27). Cortical and hippocampal slices were separated and transferred to 24 well- culture plates containing 500 μL of HBSS solution and pre-incubated for 15 min. The slices were then submitted to 2 washes with 800 μL of HBSS and the medium was changed for 280 μL of HBSS solution followed by addition of 20 μL of 0.33 and 0.66 Ci mL⁻¹ L-[³H] glutamate for cortical and hippocampal slices, respectively, containing 100 μM (final concentration) of unlabeled glutamate. Uptake was stopped after 7 and 5 minutes for cortical and hippocampal slices, respectively, by two ice-cold washes with 800 μL HBSS. NaOH (0.5 N, 300 μL for cortical slices and 200 μL for hippocampal slices) was used to lyse the tissue. Determination of the intracellular radioactivity was by scintillation counting. Sodium independent uptake was determined using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride, which was subtracted from the total uptake to obtain the sodium-dependent uptake. Determination of protein was assessed using the method of Peterson (28). The experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

Glutamate uptake data is expressed as mean \pm S.E. in percentage from the control group. Statistical analyses were performed by the Fisher test for the occurrence of seizures and by ANOVA plus Tukey's post hoc test for latency to start first seizure and duration of seizures and glutamate uptake. All results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Dexamethasone (5, 10 and 50 mg/kg) acted as anticonvulsant (data not shown). The maximum effect was observed from 5 mg/kg. Thus, this dose was used in further experiments. Dexamethasone did not show any changes in time latency for first seizure at any dose (data not shown). Mice that received saline as control presented no seizures.

Fig. 1 shows that 5 mg/kg dexamethasone protected against QA-induced seizures by 48%. In those mice that were not protected by dexamethasone, the drug reduced the duration of seizures (Fig. 2).

In Fig. 3 it is shown the effect of QA-induced seizures/dexamethasone on glutamate uptake by cortical slices from mice brain. In mice submitted to QA-induced

seizures, as previously demonstrated by our group (14, 15), the glutamate uptake decreased by 60%. In mice that received dexamethasone, the uptake did not decrease when the drug acted or not as anticonvulsant. Glutamate uptake by hippocampal slices was not affected by QA-induced seizures (data not shown).

Discussion

Glucocorticoids have been used to treat seizures for decades (18). These compounds seem to act in the cell by three mechanisms. First, they bind to glucocorticoid receptor; this complex undergoes endocytosis and goes to nucleus where binds to DNA sequences called glucocorticoid-responsive elements. The resulting complex recruits either co-activator or co-repressor proteins that modify the chromatin structure, thereby promoting or inhibiting the transcription by RNA polymerase II (29). Second, regulation of other glucocorticoid-responsive genes involves interactions among the drug-glucocorticoid receptor complex and other transcription factors, like nuclear factor- κ β (30, 31). The third mechanism is glucocorticoid signaling through membrane-associated receptors and second messengers, which is not a genomic mechanism (32, 33). This last mechanism occurs at small time when compared with the others two mechanisms cited. Considering that our work showed neuroprotective effects of dexamethasone against QA-induced seizure and that Zhu et al (34) showed a reversal

effects of an inhibitor of G protein activation in glutamatergic stimulation by dexamethasone and that a recent report described an interaction between a putative membrane glucocorticoid receptor and NMDA subtype receptor (35), we could speculate that the mechanism of dexamethasone anticonvulsant action showed here could involve membrane receptors associated protein.

In previous works from our group we showed a decreased glutamate uptake in animals submitted to seizures by QA (14, 15) or methotrexate (36). In those studies, it was observed that guanosine prevents this lowering of glutamate uptake only in animals that did not present seizures (protected by guanosine); in animals presenting seizures, although receiving guanosine, the uptake remained lower than control (13, 15).

Here we corroborate that QA-induced seizures decrease the glutamate uptake by brain cortical slices and we report for the first time that dexamethasone acted as anticonvulsant against overstimulation of the glutamatergic. However, dexamethasone administration reverted the decreasing of glutamate uptake when it acted or not as anticonvulsant. These results point that other neurochemical processes involved in the QA excitotoxicity (37) could also contribute to the anticonvulsant action of dexamethasone.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPq-Brazil and CAPES.

References:

1. Dumas, M. and Giordano, C. (1993) *L'épilepsie*. Paris: Hermann, éditeurs des sciences et des arts. 13.
2. Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54 (5): 581–618.
3. Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing. Dev.* 122 (4): 1–29.
4. Izquierdo I., Bevilaqua L. R. M., Rossato J. I., Bononi J. S., Medina J. H., Camarota M. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends. Neurosci.* 29 (9):496-505.
5. Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597–603.
6. Hollmann, M., Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31–108.
7. Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1–105.

8. Amara, S.G., Fontana, A.C. (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41: 313–318.
9. Shigeri Y., Seal R. P., Shimamoto K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev.* 45:250-265.
10. Chen, Y., Swanson, R.A. (2003) Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (2): 137–149.
11. Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58 (3): 365–370.
12. Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis.* 15 (3): 461–473.
13. Schmidt A.P., Lara D. R., Maraschin J F., Perla A. S., Souza D. O. (2000) Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43.
14. Losch D. O., Horn J. F., Rodrigues J. M., Frizzo M. E. S., Moriguchi E., Souza D. O., Wofchuk S. (2004) Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 1018: 48-54.

15. Vinade E.R., Schmidt A.P., Frizzo M. E. S., Portela L.V., Soares F. A., Schwalm F.D., Elisabetsky E., Izquierdo I., Souza D.O. (2005) Effects of Chronic Administered Guanosine on Behavioral Parameters and Brain Glutamate Uptake in Rats. *J. Neurosci. Res.* 79:248–253.
16. Soares F. S., Schmidt A. P. , Farina M., E.S. Frizzo M. E. S., Tavares R.G., Portela L. V. , Lara D., Souza D.O. (2004) Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.* 1005: 182–186.
17. Lara D.R., Schmidt A. P., Frizzo M. E. S., Burgos J. S., Ramírez G., Souza D. O. (2001) Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.*912:176–180.
18. Aird R.B., Woodbury D. M. (1975) Neurotropic drugs and epilepsy. *Int J Neurol* 10:233-240.
19. Snead O.C., Benton J.W. and Myers G.J. (1983) ACTH and prednisone in childhood seizure disorder. *Neurology.* 33:966-970.
20. Pieretti S., Giannuario DA, Loizzo A., Sagratella S., Scotti de Carolis A., Capasso, Sorrentino L. (1993) Dexamethasone prevents of epileptiform activity induced by morphine in vivo and vitro experiment. *J Pharmacol Exp Ther.*263:830-839.

21. Reagan, L.P., McEwen, B.S. (1997) Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus *J. Chem. Neuroanat.* 13:149–167.
22. Choi, D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261–1276.
23. Orrenius, S., McCabe Jr., M.J., Nicotera, P. (1992) Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol. Lett.* 64–65 (Spec No): 357–364.
24. Di S., Malcher-Lopes R., Marcheselli V.L., Bazan N.G., Tasker J.G. (2005) Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and GABA inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology.* 146:4292-4301.
25. Haley, T.J., McCormick, W.G. (1957) Pharmacologic effects of intracerebral injection of drugs in conscious mouse. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12 (1): 12–15.
26. Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O. (2002) Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (3): 353–363.
27. Thomazi, A.P., Godinho, G.F.R.S., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T. (2004) Ontogenetic

profile of glutamate uptake in brain structure slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing. Dev.* 125 (7): 475–481.

- 28 Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83(2):346–356.
- 29 Hebbar P.B., Archer T.K. (2003) Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma.* 111:495-504.
30. McKay L.I., Cidlowski J.A. (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* 20:435-59.
31. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. (2003) Interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Ver.* 24:488-522.
32. Hafezi-Moghadam A., Simoncini T., Yang Z., Limbourg F.P., Plumier J.C., Rebsamen M.C., Hsieh C.M., Chui D.S., Thomas K.L., Prorock A.J., Laubach V.E., Moskowitz M.A., French B.A., Ley K., Liao J.K. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8:473-479.

33. Cato A.C., Nestl A., Mink S. (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*. (138):RE9.
34. Zhu B.C., Zhu D. H. and Chen Y. Z. (1998) Rapid Enhancement of High Affinity Glutamate Uptake by Glucocorticoids in Rat Cerebral Cortex Synaptosomes and Human Neuroblastoma Clone SK-N-SH: Possible Involvement of G-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 261-265.
35. Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T.A., Yasumatsu, N., Kawato, S. (2002) Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 83: 1441–1451.
36. Leke R., D.L. Oliveira, A.P. Schmidt, T.T. Ávila, R.S. Jorge, A. Fischer, S. Wofchuk, D.O. Souza, L.V. Portela. (2006) Methotrexate induces seizure and decreases glutamate uptake in brain slices:Prevention by ionotropic glutamate receptors antagonists and adenosine. *Life Sciences.* 80:1–8
37. Tavares R. G., Schmidt A. P., Abud J., Tasca C. I., and Souza D. O. (2005) In vivo Quinolinic Acid Increases Synaptosomal Glutamate Release in Rats: Reversal by Guanosine. *Neurochem. Res.* 30 (4), 439-444.

Legend of Figures:

Fig. 1: Effects of dexamethasone on QA induced-seizure. *P<0.05, compared with Control (Fisher test). Number of animals: 10 (QA); 19 (QA/dexamethasone).

Fig. 2: Effects of dexamethasone on QA-induced seizure time. *P<0.05, compared to Control (one way ANOVA followed by post hoc Tukey test). Number of animals: 9 (QA); 8 (QA/dexamethasone).

Fig 3. Glutamate uptake in cortical slices from mice submitted to QA-induced seizure. The data are represented as mean \pm S.E. in percentage of vehicle group (give the absolute value). * P<0.05 when compared to all groups using one way ANOVA followed by post hoc Tukey test. Number of animals: 17 (control-corn oil); 19 (QA); 5 (QA/dexamethasone-protected); 8 (QA/dexamethasone-not protected). *P<0.05, compared to all other groups.

Percentage of Seizure

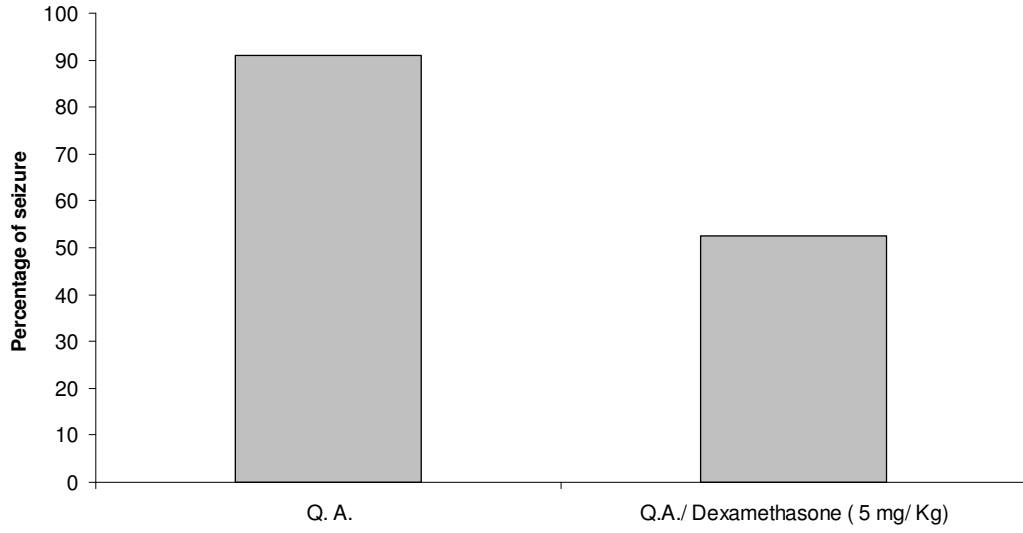


Figure 1

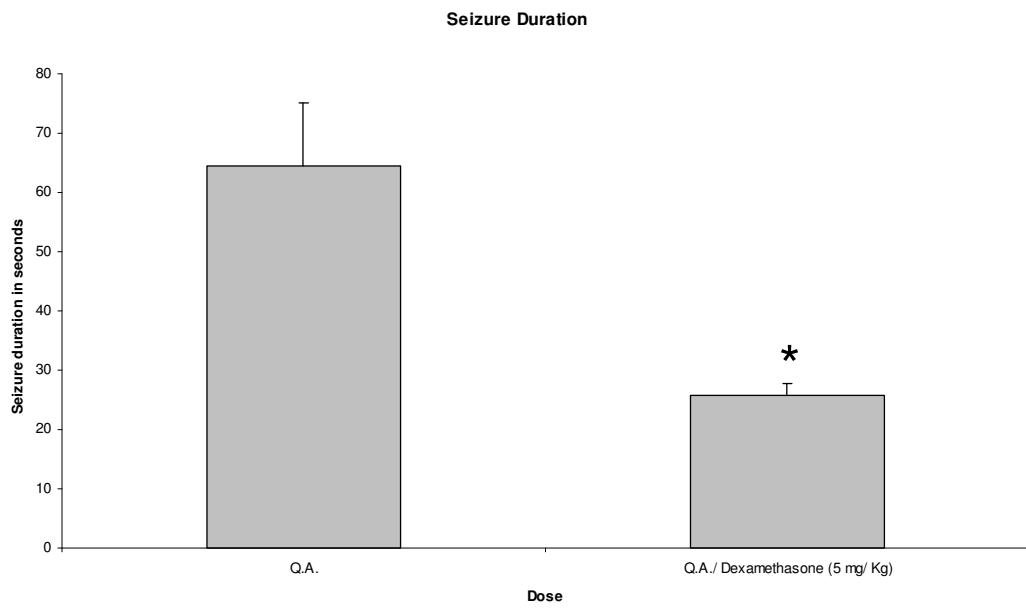


Figure 2

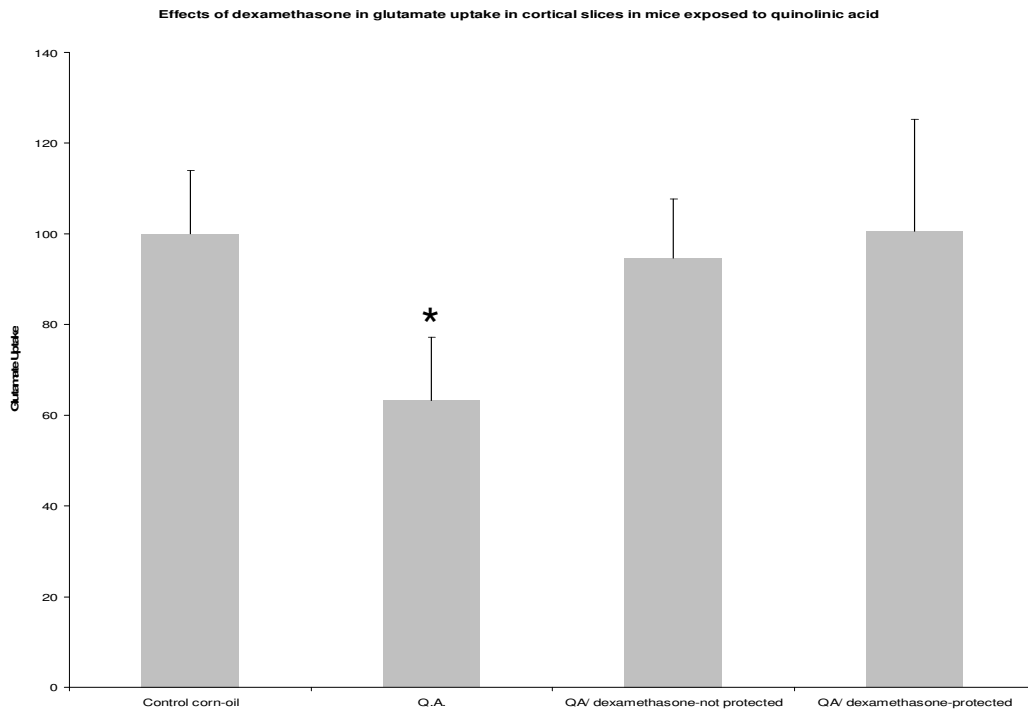


Figure 3

Parte III

Discussão

Os glicocorticóides são fármacos extensivamente usados em diversas doenças e suas propriedades como anticonvulsivantes já são conhecidas há décadas (Aird and Woodbury, 1975).

A interação entre glicocorticóides e o metabolismo do glutamato ainda é controversa. Segundo a revisão de Reagan e Mc Ewen essa interação provoca a indução do acúmulo extracelular de glutamato (Reagan and McEwen, 1997), estimulação excessiva dos seus receptores, levando ao aumento e um desequilíbrio no influxo de cálcio (Choi, 1992), produção de radicais livres, degradação dos componentes celulares e dano mitocondrial (Orrenius et al., 1992). Entretanto, um estudo recente mostrou que os glicocorticóides podem suprimir a liberação do glutamato devido a ativação de um receptor de membrana (Di et al, 2005).

Apesar dessas discrepâncias, a liberação de cortisol, um glicocorticoide endógeno, parece sofrer influência da sinalização pelo sistema glutamatérgico (Bran, 1995; Hrabovszky, 2004). No nosso estudo buscou-se uma relação entre o efeito anticonvulsivante da dexametasona com a captação de glutamato, utilizando um modelo experimental de epilepsia pela utilização de um agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Nossos resultados demonstraram que a administração intraperitoneal de 5 mg/kg de dexametasona preveniu o surgimento das convulsões induzidas pela

infusão intracerebroventricular de ácido quinolínico em 48 % dos animais analisados. Todos os animais que receberam infusão do ácido quinolínico apresentaram convulsões e diminuição na captação de glutamato em fatias de córtex, obtidas dez minutos depois da infusão do ácido. Parte dos animais que receberam o pré-tratamento com dexametasona e a seguir a infusão com o ácido quinolínico não convulsionaram, e ainda apresentaram captação de glutamato normal.

Primeiramente, o nosso estudo é pioneiro em mostrar a prevenção pela dexametasona da inibição da captação de glutamato causada pelo ácido quinolínico associada ao seu efeito anticonvulsivante. Como o efeito anticonvulsivante da dexametasona foi observado em cerca de cinquenta por cento dos animais supomos que a variabilidade genética de cada animal parece estar envolvida no seu efeito anticonvulsivante. O modelo do ácido quinolínico só pode ser feito em animais adultos por infusão direta no cérebro dada a sua pouca permeabilidade à barreira hematoencefálica. É importante ressaltar que, mesmo esse modelo sendo agudo, ainda não foi relatado nenhum fármaco cujo efeito anticonvulsivante não tenha apresentado também efeito neuroprotetor.

De forma interessante, o grupo de animais que convulsionaram mesmo com o pré-tratamento da dexametasona também não apresentaram alterações na captação de glutamato em fatias de córtex. Portanto, esses animais que convulsionaram com o ácido quinolínico na presença de dexametasona parecem manter preservada a funcionalidade do seu sistema de transporte para o glutamato. Esse resultado pode indicar que essa parcela de animais aparentemente “resistente” aos efeitos da dexametasona poderia ter

preservada a sua viabilidade neuronal. Embora não tenhamos resultados dessa hipótese dada a nossa limitação experimental, pois obtivemos as fatias de córtex dez minutos após a infusão do ácido quinolínico e não foram feitos testes de viabilidade celular, sabe-se que algumas drogas utilizadas inicialmente como anticonvulsivantes e que não apresentaram eficácia nesse sentido, foram capazes de prevenir a morte neuronal associada aos episódios convulsivos (Meldrum, 2002). É importante ressaltar que os animais que convulsionaram na presença de dexametasona apresentaram um tempo menor de duração das convulsões.

No nosso estudo, por se tratarem de fatias de córtex, não podemos diferenciar o sistema de transporte (neuronal e/ou glial) que está envolvido.

Além disso, existem outros mecanismos de excitotoxicidade causada pelo ácido quinolínico tais como agonismo NMDA e aumento da liberação do glutamato (Tavares et al, 2005).

Conclusão

A dexametasona mostrou-se eficiente como um fármaco anticonvulsivante e seu mecanismo de ação parece ser via aumento da captação do glutamato.

Muitas evidências sugerem que a dexametasona aumenta o tônus glutamatérgico. Resta estudar o mecanismo que faz com que um medicamento que aumenta os níveis de glutamato se torna neuroprotetor em um distúrbio onde a sua causa também é o aumento dos níveis extracelulares desse composto.

Mais estudos precisam ser feitos para o melhor entendimento do mecanismo de ação dos glicocorticóides no sistema nervoso central. Progressos no conhecimento desses medicamentos farão com que eles possam se tornar uma escolha plausível e segura no tratamento de epilepsias refratárias a outras medicações.

Referências Bibliográficas

Aird R.B., Woodbury DM. 1975. Neurotropic drugs and epilepsy. *Int J Neurol* 10:233-240.

Alheira F. V. e Brasil M. A. A. 2005. O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul* 27 (2): 177 – 186, 2005.

Amara, S.G., Fontana, A.C. 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41: 313–318.

Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y, Swanson RA. 2006. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci.* Jan;9(1):119-26

Autry AE, Grillo CA, Piroli GG, Rothstein JD, McEwen BS, Reagan LP. 2006. Glucocorticoid regulation of GLT-1 glutamate transporter isoform expression in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* 83(5-6):371-9.

Brann DW. 1995. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61:213-225.

Betting L. E., Kobayashi E., Montenegro M. A., Min L. L., Cendes F., Guerreiro M. M. , Guerreiro C. A. M. 2003. TRATAMENTO DE EPILEPSIA. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 61(4):1045-1070.

Canfiel P. and Canfield C. 2006. The Office Management of Epilepsy. *Seminars in Pediatric Neurology,* 13:201 – 207.

Campbell S, Hablitz JJ. 2005. Modification of epileptiform discharges in neocortical neurons following glutamate uptake inhibition. *Epilepsia.* 46 Suppl 5:129-33

Chen, Y., Swanson, R.A. (2003) Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (2): 137–149.

Danilczuk Z, Sekita-Krzak J, Lupina T, Danilczuk M, Czerny K. 2006. Influence of dizocilpine (MK-801) on neurotoxic effect of dexamethasone: behavioral and histological studies. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 66(3):215-26.

Cato A.C., Nestl A., Mink S. 2002. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE.* (138):RE9.

Chen, Y., Swanson, R.A. 2003. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (2): 137–149.

Choi, D.W. 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261–1276.

- Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1–105.
- De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. 2003. Interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Ver.* 24:488-522.
- Di S., Malcher-Lopes R., Marcheselli V.L., Bazan N.G., Tasker J.G. 2005. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and GABA inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology.* 146:4292-4301.
- Dumas, M. and Giordano, C. 1993. *L'épilepsie*. Paris: Hermann, éditeurs des sciences et des arts. 13.
- Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O. 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (3): 353–363.
- Galvan A., Kuwajima M. And Smith Y. 2006. Glutamate And Gaba Receptors And Transporters In The Basal Ganglia: What Does Their Subsynaptic Localization Reveal About Their Function? *Neuroscience* 143: 351- 375.
- Gareiso, A. & Escardó, F. *La epilepsia en el niño: nuevos conceptos, nuevas técnicas, nuevos tratamientos*. Buenos Aires: El Ateneo Editorial, 1949.
- Gastaut, H. *Dictionary of epilepsy*. Geneva: World Health Organization, 1973.
- Guerreiro, Carlos Alberto Mantovani. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editora, 1993.
- Hrabovszky E, Wittmann G, Turi GF, Liposits Z, Fekete C. 2004. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology.* 146: 1341-1347.
- Haley, T.J., McCormick, W.G. 1957. Pharmacologic effects of intracerebral injection of drugs in conscious mouse. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12 (1): 12–15.
- Hafezi-Moghadam A., Simoncini T., Yang Z., Limbourg F.P., Plumier J.C., Rebsamen M.C., Hsieh C.M., Chui D.S., Thomas K.L., Prorock A.J., Laubach V.E., Moskowitz M.A., French B.A., Ley K., Liao J.K. 2002. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8:473-479.
- Hebbar P.B., Archer T.K. 2003. Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma.* 111:495-504.

- Hollmann, M., Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31–108.
- Izquierdo I., Bevilaqua L. R. M., Rossato J. I., Bononi J. S., Medina J. H., Camarota M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends. Neurosci.* 29 (9):496-505.
- Jacobs C. M., Trinh M.D., Rootwelt T., Lømo J., Paulsen R. E. 2006. Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg²⁺ in cerebellar granule neurons. *Brain res.* 1070: 116-123.
- Kalapos M. P. 2006. Possible mechanism for the effect of ketogenic diet in cases of uncontrolled seizures The reconsideration of acetone theory. *Med Hypotheses* doi:10.1016/j.mehy.2006.10.041
- Kwan P, Brodie MJ. 2000. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Méd.* 342:314-319.
- Lara D.R., Schmidt A. P., Frizzo M. E. S., Burgos J. S., Ramírez G., Souza D. O. 2001. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.*912:176–180.
- Leke R., D.L. Oliveira, A.P. Schmidt, T.T. Ávila, R.S. Jorge, A. Fischer, S. Wofchuk, D.O. Souza, L.V. Portela. 2006. Methotrexate induces seizure and decreases glutamate uptake in brain slices: Prevention by ionotropic glutamate receptors antagonists and adenosine. *Life Sciences.* 80:1–8
- Li ZL, Zhu CG, Wei Y, Ma CL. 1999. The influence of dexamethasone on behaviors, EEG and metabotropic glutamate receptor 1 α expression in the seizure rats. *Acta Anat Sin (Chin)* 30:113-118.
- Losch D. O., Horn J. F., Rodrigues J. M., Frizzo M. E. S., Moriguchi E., Souza D. O., Wofchuk S. 2004. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 1018: 48-54.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58 (3): 365 - 370.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis.* 15 (3): 461 - 473.
- McKay L.I., Cidlowski J.A. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* 20:435-59.
- Meldrum BS. Implications for neuroprotective treatments. 2002. *Prog Brain Res.* 135:487-95

Murphy BE. Steroids and depression. 1991. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 5:537-59.

Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. 2007. Inhibition of glutamate transporters results in a "suppression-burst" pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia.* Jan;48(1):169-74

Moreira S. R. G. 2004. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. *Mental.* 3:107 – 122.

Nakanishi, S., 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597–603.

Oliveira, D.L., Horn, J.F., Rodrigues, J.M., Frizzo, M.E.S., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S. 2004. Quinolic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 1018 (1): 48–54.

Orrenius, S., McCabe Jr., M.J., Nicotera, P. 1992. Ca (2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol. Lett.* 64–65 (Spec No): 357–364.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54 (5): 581–618.

Patten SB, Neutel CI. 2000. Corticosteroid-induced adverse psychiatric effects: incidence, diagnosis and management. *Drug Saf.* 22:11-22.

Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83(2):346–356.

Pieretti S., Giannuario DA, Loizzo A., Sagratella S., Scotti de Carolis A., Capasso, Sorrentino L. 1993. Dexamethasone prevents of epileptiform activity induced by morphine in vivo and vitro experiment. *J Pharmacol Exp Ther.* 263:830-839.

Reagan, L.P., McEwen, B.S. 1997. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus *J. Chem. Neuroanat.* 13:149–167.

Rigatti M. And Trevisol-Bittencourt P. C. 1999. Causas de epilepsia tardia em uma clínica de epilepsia do Estado de Santa Catarina. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 57:787-792

Segovia, G., Porrás, A., Del Arco, A., Mora, F. 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing. Dev.* 122 (4): 1–29.

Soares F. S., Schmidt A. P. , Farina M., E.S. Frizzo M. E. S., Tavares R.G., Portela L. V. , Lara D., Souza D.O. 2004. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.* 1005: 182–186.

Schmidt A.P., Lara D. R., Maraschin J F., Perla A. S., Souza D. O. 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43.

Shigeri Y., Seal R. P., Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev.* 45:250-265.

Snead O.C., Benton J.W. and Myers G.J. 1983. ACTH and prednisone in childhood seizure disorder. *Neurology.* 33:966-970.

Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T.A., Yasumatsu, N., Kawato, S. 2002. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 83: 1441–1451.

Tavares R. G., Schmidt A. P., Abud J., Tasca C. I., and Souza D. O. 2005. In vivo Quinolinic Acid Increases Synaptosomal Glutamate Release in Rats: Reversal by Guanosine. *Neurochem. Res.* 30 (4): 439-444.

Thomazi, A.P., Godinho, G.F.R.S., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T. 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structure slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing. Dev.* 125 (7): 475–481.

Vinade´ E.R., Schmidt A.P., Frizzo M. E. S., Portela L.V., Soares F. A., Schwalm F.D., Elisabetsky E., Izquierdo I., Souza D.O. 2005. Effects of Chronic Administered Guanosine on Behavioral Parameters and Brain Glutamate Uptake in Rats. *J. Neurosci. Res.* 79:248–253.

Wannacher L. e Ferreira M. B. C.,1998. Fuchs F. D. e Wannmacher L In: *Farmacologia Clínica.* Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2 ed cap 22 p 194-202.

Wolkowitz OM, Reus VI. 1999. Treatment of depression with antigluocorticoid drugs. *Psychosom Med.* 61:698 - 711.

Zhu B.C., Zhu D. H. and Chen Y. Z. 1998. Rapid Enhancement of High Affinity Glutamate Uptake by Glucocorticoids in Rat Cerebral Cortex Synaptosomes and Human Neuroblastoma Clone SK-N-SH: Possible Involvement of G-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 261-265.