

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

**KAMILA CAGLIARI ZENKI**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ANTAGONISMO DO RECEPTOR N-  
METIL-D-ASPARTATO PELA MEMANTINA SOBRE A  
NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA PELO *STATUS EPILEPTICUS* EM  
RATOS JOVENS**

**Porto Alegre, março de 2015.**

**KAMILA CAGLIARI ZENKI**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ANTAGONISMO DO RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO PELA MEMANTINA SOBRE A NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA PELO *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 Lösch de Oliveira**

**Porto Alegre, março de 2015.**

*“Os homens devem saber que do encéfalo, e apenas do encéfalo, vem nossos prazeres, alegrias, sorrisos e gracejos, assim como nossas mágoas, dores, sofrimentos e lágrimas. Por meio dele, em particular, nós pensamos, vemos, ouvimos e distinguimos o feio do bonito, o prazer do desprazer... É a mesma coisa que nos torna loucos ou delirantes, que nos inspira temor e medo, seja durante a noite ou durante o dia, e nos torna sonolentos, gera erros inoportunos, ansiedades sem razão, distrações e atos contrários aos nossos próprios hábitos. Essas coisas vêm todas do encéfalo, e quando este não está saudável, quando se torna anormalmente quente, frio, úmido ou seco, ou sofre qualquer outra lesão não natural a qual não estava acostumado, ele se afasta das necessidades, e quando ele se afasta nem visão nem audição ficam estáveis... E, tão somente quando o encéfalo está estável, o homem pode pensar corretamente.”*

**Hipócrates; Século Quinto, a.C.**

**Aos meus pais, Irvolei e Lourdes por todo o empenho, compreensão e incentivo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Irvolei e à minha mãe Lourdes toda e qualquer forma de agradecimento parecerá insuficiente. Desde o princípio me estimularam aos estudos e sempre se dedicaram para me oferecer uma educação de qualidade. Não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e concluir as etapas da minha formação com honestidade e amor.

À minha irmã Karina pela grande cumplicidade, amizade fiel e absoluta. Muito obrigada por estar comigo em todos os momentos e por ser a melhor irmã que eu poderia desejar. Mana, obrigada por existir.

Ao meu segundo eu Eduardo, pelo seu amor que me inspira e fortalece, me dá motivos para seguir em frente; sou a ti grata eternamente por todo o apoio emocional e intelectual ao longo dessa jornada e por participar incondicionalmente deste sonho e da conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Diogo, que acreditou e investiu na minha proposta. Quero agradecer pela liberdade e pelo estímulo aos pensamentos criativos; quero agradecer pelas lições que me tornaram profissional e por ter me guiado com paciência e sabedoria por este caminho, fazendo-me uma apaixonada pela arte de ensinar.

Aos meus colegas do laboratório 24, por terem se tornado uma família, pela qual tenho muito respeito e admiração. As frustrações, vitórias... Tristezas e alegrias... Foram anos únicos na minha vida, e jamais poderei esquecer. Quero agradecer em especial, ao Ben Hur e à Mery por tudo o que me ensinaram e por todo o suporte, por terem tido paciência (e por terem até hoje!). Obrigada aos ICs, ainda integrantes e também aos antigos, sempre fundamentais para o processo de formação acadêmica dos mestres e doutores. Obrigada também, Denis e Rico, professores extraordinários que mudaram minha concepção, instigaram minha curiosidade. Agradeço ao Gil, por tornar meus dias menos estressantes (ou mais, às vezes), mas por quebrar com a rotina de fato, com sua amizade de outro planeta: Valeu por tudo Gil. Aos professores Diogo, Roska e Maria Elisa, aos colegas do laboratório 26 e 28 (incluindo os médicos... hehe), em especial ao Zimmer, Adriano, Vitor e Giordano: Obrigada a todos vocês, que me acolheram e proporcionaram uma convivência profissional divertida.

Agradeço aos funcionários do departamento, que sempre batalham por um serviço de excelência, e nos oferecem condições adequadas para a realização dos experimentos.

Às fontes financiadoras de bolsas, CNPQ, CAPES e FAPERGS.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>1. Neurotransmissão Glutamatérgica</b> .....	2
<u>1.1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos - iGluRs</u> .....	3
<u>1.2. Receptores NMDA</u> .....	4
<i>1.2.1. Composição e estrutura dos NMDARs</i> .....	4
<i>1.2.2. Expressão e localização dos NMDARs</i> .....	6
<u>1.3. Farmacologia dos NMDARs</u> .....	7
<u>1.4. Excitotoxicidade e NMDARs</u> .....	8
<b>2. Epilepsia</b> .....	8
<u>2.1. Epilepsia do lobo temporal</u> .....	9
<u>2.2. Status Epilepticus</u> .....	10
<u>2.3. Abordagens farmacológicas nas epilepsias</u> .....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	13
<u>3.1. Objetivo geral</u> .....	13
<u>3.2. Objetivos específicos</u> .....	13
<b>4. Capítulo I</b> .....	15
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	42

## RESUMO

O *Status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina causa uma massiva neurodegeneração em diversas regiões cerebrais, e a maioria dos fármacos antiepilépticos clássicos não são suficientemente eficazes para proteger os neurônios da morte. Antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato apresentam ação anticonvulsiva e são atualmente capazes de proporcionar neuroprotecção contra a morte neuronal induzida pelo SE. No entanto, estes compostos demonstraram inúmeros efeitos colaterais. Apesar disso, a memantina, um antagonista NMDA de baixa afinidade, é clinicamente bem tolerada e não induz tantos efeitos indesejados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito neuroprotetor da memantina contra a degeneração neuronal induzida pelo *status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina nos períodos iniciais da vida. Filhotes de ratos Wistar receberam memantina (20 mg / kg ip) em diferentes regimes de tratamento. A neurodegeneração foi quantificada por fluoro jade C. Em CA1 a neurodegeneração diminuiu significativamente quando os animais receberam memantina nos regimes de pós-tratamento realizados às 0 e 0,25 horas. Além disso, o pós-tratamento foi capaz de proteger contra a neurodegeneração em uma região da amígdala. O pré-tratamento com memantina mostrou uma redução da morte celular no tálamo. Nossos resultados demonstram o efeito neuroprotetor da memantina na morte neuronal induzida pelo SE no início da vida. Este efeito é dependente do tempo de tratamento e da região cerebral.

## ABSTRACT

Status epilepticus induced by LiCl-pilocarpine is accompanied by neurodegeneration and the classical antiepileptic drugs are not effective in protect neurons from death. Typical N-methyl-D-aspartate receptor antagonists exhibit anticonvulsant action and are currently able to provide neuroprotection against SE-induced neuronal death. However, these compounds have demonstrated undesirable side effects. Despite this, memantine, a low-affinity NMDA antagonist, is clinically well tolerate and does not induce side effects. Therefore, the aim of the present study was to investigate the neuroprotective effect of the memantine against neuronal degeneration induced by early life LiCl-Pilocarpine-induced status epilepticus. Wistar pup rats received memantine (20 mg/kg i.p.) at different treatment regimens before and after SE induction. Neurodegeneration was quantified by fluoro jade C staining. In CA1 subfield neurodegeneration was significantly decreased when animals received memantine at 0h and 0.25h post-treatment regimens. Additionally, post-treatment was able to protect against neurodegeneration in amygdala region. Memantine pre-treatment showed a reduction of cell death in thalamus. Our results demonstrated the neuroprotective effect of memantine on neuronal loss induced by SE early in life. This effect was time- and region-dependent.



## Lista de abreviaturas

AMPARs – receptores amino-3-hidroxi-S-metil-isoxazol-4-propionato

GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GD – giro denteado

iGluRs – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

KARs – receptores cainato

mGluRs – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MN – memantina

NMDARs – receptores N-metil-D-aspartato

SE – Status epilepticus

SNC – sistema nervoso central

**PARTE I**

# INTRODUÇÃO

## 1. Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é um aminoácido abundante e essencial para diversas funções do cérebro, mais notavelmente como um neurotransmissor excitatório e precursor do neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico, o GABA (Bak et al., 2006; Sanacora et al., 2008). Suas vias de transmissão são fundamentais para a regulação de inúmeros eventos fisiológicos, tais como: memória e aprendizado (Izquierdo and Medina, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia et al., 2001), proliferação e migração celular (McDonald and Johnston, 1990). Por não ser capaz de permear a barreira hematoencefálica, a síntese de glutamato precisa ser realizada por precursores locais. O principal precursor é a glutamina liberada por células gliais, entretanto, não menos importante, é a síntese a partir da transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Nedergaard et al., 2002). Deste modo, o glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos principalmente pela ação da enzima glutaminase, que realiza uma hidrólise da glutamina, proveniente principalmente dos astrócitos (Schousboe et al., 1997). Após, o glutamato é estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100 mM (Nedergaard et al., 2002).

A neurotransmissão eficiente requer a interação precisa dos receptores e neurotransmissores na pré e pós-sinapse. Existem dois grandes grupos de receptores sinápticos que reconhecem os neurotransmissores: os receptores ionotrópicos, também conhecidos como canais iônicos dependentes de ligante, que após a ligação sítio-específica do neurotransmissor, respondem rapidamente para despolarizar o neurônio e propagar o potencial de ação (ou hiperpolarizar o neurônio e inibir potenciais de ação adicionais), permitindo assim a passagem de íons (Kandel et al., 2013); e os receptores metabotrópicos, ou acoplados à proteína G, que também têm um sítio de reconhecimento de neurotransmissor extracelular, no entanto, quando um neurotransmissor está associado a ele, uma molécula intermediária na célula pós-sináptica, chamada de proteína G, é ativada e, desencadeia uma transdução de sinal mediada por segundos mensageiros, causando uma resposta mais lenta (Yin and Niswender, 2014).

Os canais iônicos dependentes de ligante desempenham um papel central na comunicação intercelular no sistema nervoso, porque perfazem a maquinaria celular para fluxo de íons através da membrana e, portanto, a base da excitação dos neurônios. Estes canais são conjuntos de proteínas oligoméricas que convertem um sinal químico em um fluxo de íons através do neurônio pós-sináptico (Ashcroft, 2006). Para que a neurotransmissão glutamatérgica ocorra, as vesículas de glutamato liberam o seu conteúdo na fenda sináptica, e o neurotransmissor se liga aos receptores expressos especificamente na superfície celular: receptores do tipo ionotrópicos (iGluRs) e/ou metabotrópicos (mGluRs). Por isso, é a concentração de glutamato no fluido extracelular circundante que determina a extensão da estimulação do receptor (Danbolt, 2001; Yin and Niswender, 2014). Para que a neurotransmissão glutamatérgica esteja fisiologicamente preservada, resguardando as funções cerebrais essenciais, é crucial que a concentração de glutamato na fenda sináptica seja mantida baixa, em torno de 1 – 10  $\mu\text{M}$ . Assim, um dos papéis mais importantes dos astrócitos no cérebro, é a remoção deste neurotransmissor através de um sistema de transporte de alta afinidade (Danbolt, 2001; McKenna, 2007, 2013). Os astrócitos executam esta função chave através da expressão de transportadores específicos para glutamato, os quais removem rápida e eficientemente o glutamato, cuja concentração aumenta para cerca de 100  $\mu\text{M}$  – 1 mM após a despolarização dos neurônios (Bergles et al., 1999; Matsui et al., 2005).

### 1.1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos - iGluRs

Esta família compreende três receptores: kainato (KARs), amino-3-hidroxi-S-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDARs). Desde 1990, quando se intensificaram os estudos sobre os KARs, tornou-se claro que eles desempenham papéis muito distintos dos outros iGluRs no cérebro, apesar de semelhanças estruturais e funcionais. Os KAR têm funções diversas que dependem da localização subcelular e da estruturação das subunidades, que resultam em distintos mecanismos de sinalização (Perrais et al., 2010). Já os iGluRs dos tipos AMPA e NMDA medeiam a maior parte da transmissão sináptica no encéfalo. Os AMPARs são os principais mediadores da transmissão excitatória rápida no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. São compostos por quatro subunidades, consistindo em dois dímeros formados por combinações de quatro subunidades, GluA 1-4. As combinações GluA1/2 e GluA2/3 são predominantes para a composição dos canais (Anggono and

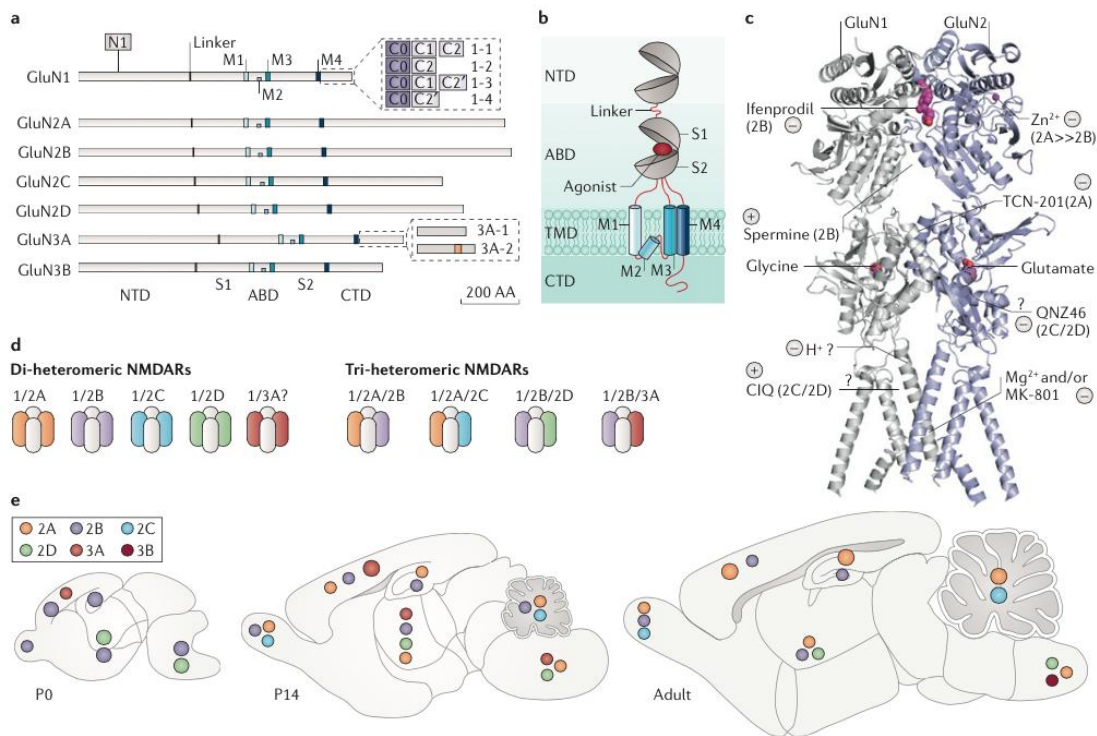
Huganir, 2012). Os AMPARs coexistem com NMDARs em muitas sinapses no encéfalo, de forma que muitos potenciais excitatórios pós-sinápticos mediados por glutamato possuem componentes formados por ambos (Cotman et al., 1988; Fan et al., 2014).

## 1.2. Receptores NMDA

Os NMDARs são canais dependentes de voltagem, e diferentemente dos AMPARs e KARs, que são permeáveis somente ao íon  $\text{Na}^{+2}$ , são também altamente permeáveis a  $\text{Ca}^{+2}$  e possuem como co-agonistas glicina e D-serina (Henneberger et al., 2013; Johnson and Ascher, 1987; Kemp and Leeson, 1993; Mothet et al., 2000). Estes receptores têm um papel crucial na plasticidade sináptica, com efeitos diretos na potenciação de longa duração e na depressão de longa duração. Em contrapartida, a hiperestimulação dos NMDARs está relacionada a um evento patofisiológico denominado de excitotoxicidade neurodegenerativa (Mehta et al., 2013; Nicoletti et al., 1996).

### **1.2.1. Composição e estrutura dos NMDARs**

Os NMDARs, assim como outros iGluRs, são complexos heteromultimérico formados por quatro subunidades formadoras do poro do canal, permitindo assim, a passagem de íons. Foram identificadas 3 famílias de subunidades dos NMDARs: NR1, NR2 e NR3 (recentemente renomeados, GluN1, GluN2 e GluN3, respectivamente) (Paoletti, 2011). Tipicamente os NMDARs são formados por duas subunidades NR1, as quais existem em oito variantes (NR1 1a-4a; 1b-4b) geradas através de *splicing* alternativo do mRNA de um mesmo gene (Dingledine et al., 1999; Watkins and Jane, 2006), e duas subunidades NR2, as quais existem em quatro variantes (NR2A-D). Menos comumente, os NMDARs podem conter subunidades NR3 (NR3A-B). Desta forma, levando-se em consideração que a subunidade NR1 é constitutiva, ou seja, existente em todos os NMDARs, podem existir diferentes combinações ao longo das diferentes regiões cerebrais (Figura 1), cujas predominantes são NR1/NR2, NR1/NR2/NR3 ou NR1/NR3 (Henson et al., 2010; Paoletti et al., 2013).



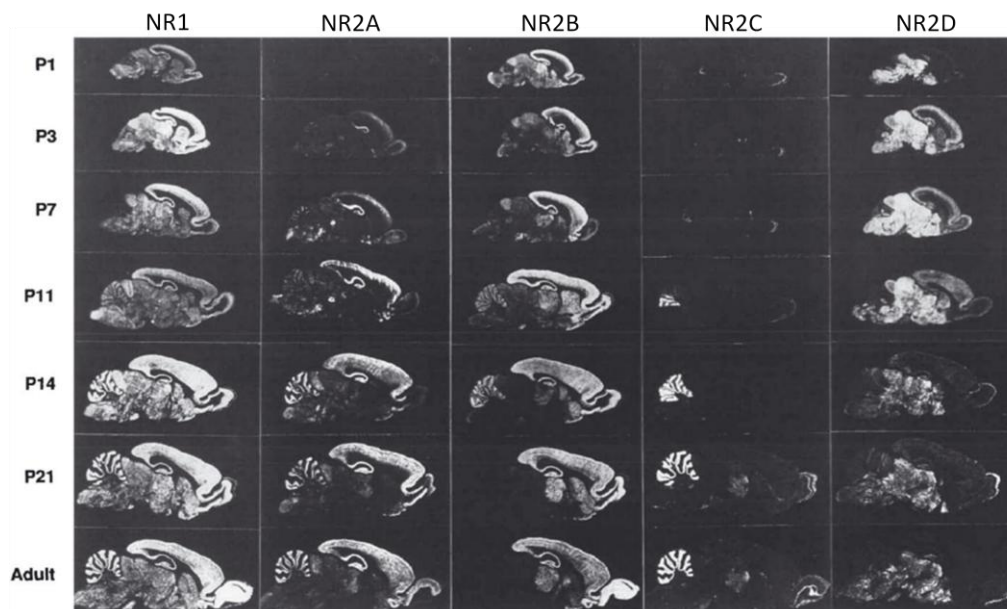
**Figura 1. Diversidade, estrutura e expressão dos Receptores NMDA no encéfalo de mamíferos.** *a) subunidades dos receptores NMDA. b) arquitetura modular das subunidades dos receptores NMDA. c) estrutura tridimensional heterodimérica do receptor NMDA. d) diferentes combinações de subunidades dos receptores NMDA. e) perfil ontogenético da expressão dos diferentes tipos de receptores NMDA no encéfalo de mamíferos.* Fonte: Adaptado de Paoletti et al., 2013.

Do ponto de vista estrutural, os NMDARs são proteínas integrais de membrana que incorporam quatro grandes subunidades formando um poro central com permeabilidade seletiva para os cátions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> (Paoletti et al., 2013). Este canal catiônico 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) (Paoletti, 2011). Durante o potencial de repouso, os NMDARs estão normalmente bloqueados por íons Mg<sup>+2</sup> (Monaghan and Jane, 2009; Riedel et al., 2003), impedindo assim a passagem de outros íons. Para que o Mg<sup>+2</sup> seja liberado do poro e ocorra a consequente ativação do NMDAR, é necessária uma despolarização da membrana neuronal (Fan et al., 2014; Monaghan and Jane, 2009).

### 1.2.2. Expressão e localização dos NMDARs

Os NMDARs são amplamente distribuídos no SNC, sendo predominantemente expressos na região CA1 do hipocampo (Monaghan and Cotman, 1985). No encéfalo maduro, a expressão dos mRNAs das subunidades NR2A-D varia de acordo com a estrutura do SNC. As subunidades NR2A e NR2B são principalmente encontradas no córtex cerebral e no hipocampo (Cull-Candy et al., 2001; Monyer et al., 1994; Sheng et al., 1994) e sofrem alterações em sua expressão durante os diferentes estágios do desenvolvimento cerebral (Figura 2). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento cerebral as conexões sinápticas ainda não estão bem estabelecidas e, portanto, os NMDARs são predominantemente extra-sinápticos. Nesta etapa do desenvolvimento, neurônios corticais e hipocámpais expressam principalmente a subunidade NR2B, enquanto que a subunidade NR2A aumenta sua expressão ao longo do desenvolvimento (Akazawa et al., 1994; Li et al., 2002).

Estudos sugerem que em sinapses maduras, a subunidade NR2A é expressa principalmente no botão sináptico (NMDARs sinápticos) enquanto que a subunidade NR2B é expressa na extra-sinapse (NMDARs extrasinápticos), e que as diferentes localizações dos NMDARs refletem diferentes funções destes receptores, as quais são influenciadas não somente pelo local onde se encontram, mas também pelas subunidades que os compõem (Hardingham et al., 2002; Li et al., 2002).



**Figura 2. Distribuição do mRNA das subunidades dos NMDARs no cérebro de rato ao longo do desenvolvimento.** Fonte: Adaptado de Akazawa et al., 1994.

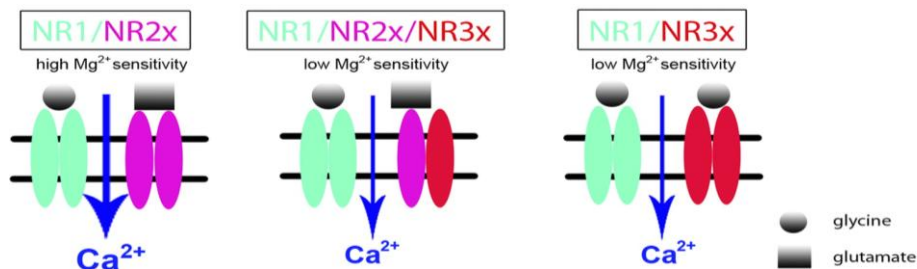
### 1.3. Farmacologia dos NMDARs

Quando o glutamato se liga aos AMPARs a membrana celular fica despolarizada, e o  $Mg^{+2}$  presente no poro do NMDAR é deslocado para o meio extracelular, permitindo o influxo de íons pelo canal. Dessa forma, a ativação dos NMDARs depende tanto da ligação do glutamato diretamente neste receptor, bem como da despolarização mediada por AMPA. Assim, a entrada de íons através dos NMDARs é considerada dependente de voltagem (Fan et al., 2014; Monaghan and Jane, 2009; Rao and Finkbeiner, 2007).

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). Um NMDAR funcional, responsivo ao glutamato e à glicina, necessariamente requer a presença de, pelo menos, uma subunidade NR1 e uma subunidade NR2 (Monaghan and Jane, 2009), uma vez que o glutamato se liga a NR2, enquanto a glicina ou D-serina se ligam a NR1 e NR3 (Henson et al., 2010). Adicionalmente, diferenças na composição e arranjo das subunidades, e, portanto, a diversidade da expressão das subunidades em várias combinações, confere aos diferentes tipos de NMDARs funções e propriedades farmacológicas distintas (Chatterton et al., 2002; Prybylowski and Wenthold, 2004). Mesmo os NMDARs formados por diferentes combinações de NR1/NR2 podem apresentar discrepâncias funcionais entre si, tais como farmacocinética, condutância e permeabilidade a íons diferenciada, tendo em vista que existe um grande repertório de combinações dentro destas subunidades (Ogden and Traynelis, 2011; Paoletti et al., 2013).

Do ponto de vista prático, os receptores compostos pelas subunidades NR2A ou NR2B exibem alta condutância e elevada sensibilidade ao bloqueio por  $Mg^{+2}$ , enquanto que os NMDARs que contêm subunidades NR2C ou NR2D apresentam condutâncias menores e uma menor sensibilidade para  $Mg^{+2}$  (Low and Wee, 2010; Paoletti et al., 2013). Além disso, sendo a subunidade NR2 responsável pela modulação do influxo de íons ativado pelo glutamato, os NMDARs formados com NR1/NR2/NR3 exibem baixa condutância de  $Ca^{+2}$  e permeabilidade reduzida (Figura 3) (Low and Wee, 2010; Paoletti et al., 2013).





**Figura 3. Diferentes combinações das subunidades dos NMDARs conferem diferentes características farmacológicas.** Fonte: Adaptado de Low C.M., 2010.

#### 1.4. Excitotoxicidade e NMDARs

A mais de cinco décadas surgiu a primeira evidência de que o glutamato possui efeitos tóxicos, podendo ser capaz de causar a morte de células da retina (Lucas and Newhouse, 1957). O termo excitotoxicidade foi proposto posteriormente por John Olney (1969), demonstrando que o excesso de glutamato desencadeia este fenômeno no cérebro, e que este é dependente do influxo de Ca<sup>2+</sup> (Choi, 1987) através dos NMDARs (Choi et al., 1988). Atualmente, esta modulação da neurotransmissão mediada pelos NMDARs têm importantes implicações para a origem da lesão e da morte celular observadas em um amplo espectro de condições neurológicas diferentes, incluindo acidente vascular cerebral, hipóxia, isquemia, epilepsia entre outras (Flores-Soto et al., 2012). Estas condições compartilham características patognomônicas comuns, incluindo perda neuronal gradual e seletiva, principalmente devido à hiperatividade dos NMDARs, com um aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma e a geração de espécies reativas de oxigênio (Di Maio et al., 2011; Flores-Soto et al., 2012).

## **2. Epilepsia**

A epilepsia é uma condição neurológica 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). Esta condição tende a perdurar durante toda a vida do indivíduo acometido, sendo que os danos causados ao organismo podem ser irreversíveis, tais como morte neuronal, alterações comportamentais, prejuízos na memória e aprendizado, entre outros. Desta forma, a importância médica das epilepsias se relaciona principalmente às consequências psicopatológicas e sociais (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2004).

Uma crise epiléptica é o resultado de uma descarga elétrica excessiva, anormal e geralmente sincrônica de um grupo de neurônios que pode estar localizado em qualquer região cerebral. As manifestações clínicas destas crises dependerão da região onde a descarga se inicia e da 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 de etiologia desconhecida (Bear et al., 2001).

### 2.1. Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal é a condição epiléptica de maior prevalência na idade adulta (Elger and Schmidt, 2008), e cerca de 30% dos pacientes com este diagnóstico são refratários aos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente. A única alternativa para os casos de refratariedade é a remoção cirúrgica da área epileptogênica, entretanto cerca de 20% dos pacientes continuam apresentando crises (Engel, 2001a).

Os pacientes com epilepsia do lobo temporal frequentemente apresentam esclerose hipocampal, caracterizada pela morte neuronal progressiva e gliose reativa, principalmente na região CA1 e hilo do hipocampo (McNamara, 1994), entretanto ainda não está completamente elucidado de que forma essa esclerose hipocampal influencia na geração de novas crises. Aparentemente existe uma forte correlação entre danos que ocorrem nas fases iniciais do desenvolvimento cerebral com o aparecimento da esclerose hipocampal, como fatores de risco predisponentes para a epilepsia do lobo temporal (Meyer et al., 1954; Minami et al., 2014). Os danos que podem levar à epilepsia do lobo temporal na vida adulta são associados principalmente com convulsões febris e crises epilépticas prolongadas (*status epilepticus* – SE) (Mathern et al., 2002), tendo em vista que aproximadamente 80% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentaram, durante os primeiros anos de vida, convulsões febris ou SE (Mathern et al., 1995; VanLandingham et al., 1998).

## 2.2. Status Epilepticus

O SE é caracterizado por uma crise epiléptica que dura pelo menos 30 minutos, ou crises sucessivas nas quais os níveis de consciência do paciente não são recuperados no intervalo entre as crises (Al-Mufti and Claassen, 2014). Alguns pesquisadores consideram que crises contínuas com duração inferior a 30 minutos podem ser classificadas como SE. Isso se deve a evidências de que qualquer pessoa que apresente atividade convulsiva contínua sem recuperar a consciência por um período de tempo igual ou superior a 5 minutos irá culminar com o SE (Sirven and Waterhouse, 2003).

Indivíduos acometidos pelo SE durante a infância podem apresentar, na idade adulta, alterações no comportamento emocional, esclerose hipocampal, déficit cognitivo e outras complicações associadas (van Esch et al., 1996). Morfologicamente, observa-se uma redução do volume hipocampal, amígdalar e do córtex perirrinal de ratos que foram induzidos ao SE aos 12 dias de vida (Nairismagi et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que ratos submetidos à crise convulsiva durante duas horas apresentam morte neuronal no núcleo mediodorsal do tálamo (Kubova et al., 2001), assim como a indução do SE por LiCl-pilocarpina causa morte neuronal nas regiões CA1 e giro denteado (GD) do hipocampo (de Oliveira et al., 2011).

A pilocarpina, um agonista colinérgico, administrada em alta dose, induz uma crise epiléptica causada, inicialmente, pela ação estimulatória da pilocarpina sobre o sistema colinérgico, enquanto a manutenção da crise se deve a ativação do sistema glutamatérgico, caracterizando um modelo de SE (McDonough and 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 consequentemente a mortalidade, sem alterar, no entanto, o padrão convulsivo (Clifford et al., 1987).

## 2.3. Abordagens farmacológicas nas epilepsias

Efeitos anticonvulsivos e efeitos neuroprotetores não são sinônimos, embora algumas vezes, se uma crise convulsiva severa ou o SE são prevenidos ou significativamente atenuados através de uma terapia antiepiléptica bem sucedida, o dano

neuronal pode não ocorrer. Neste aspecto, Hoffman e colaboradores 2003 demonstraram que a administração de progesterona antes da crise convulsiva foi capaz de proteger contra o dano neuronal, mas somente nos animais onde houve prevenção da geração das crises concomitantemente. Quando a crise apresentou visualmente uma intensidade semelhante à crise de um rato não tratado, a progesterona não foi efetiva para o bloqueio do dano neuronal (Hoffman et al., 2003; Velisek and Veliskova, 2008). Esses resultados mostraram que o efeito neuroprotetor da progesterona foi resultado das propriedades anticonvulsivantes, muito embora, na maioria das terapias convencionais para o tratamento das crises, os efeitos neuroprotetores não sejam comumente observados (Velisek and Veliskova, 2008). Assim, uma terapia anti-convulsiva sintomática que previna a morte neuronal, ou a combinação da terapia neuroprotetora com uma anti-convulsivante constituem a melhor abordagem farmacológica atual para o tratamento da epilepsia.

Estudos em modelos animais demonstram que o SE no cérebro em desenvolvimento causa uma morte neuronal expressiva em diversas regiões como hipocampo, córtex, amígdala e tálamo (de Oliveira et al., 2011; Kubova et al., 2004; Sankar et al., 1998), e que esta neurodegeneração está associada com a hiperestimulação dos NMDARs (Holopainen, 2008). Adicionalmente, antagonistas de alta afinidade do NMDAR como TCP, MK-801 e cetamina são neuroprotetores contra a morte neuronal induzida pelo SE (Brandt et al., 2003; Lerner-Natoli et al., 1991; Stafstrom et al., 1997). Por outro lado, o tratamento de desordens do SNC com antagonistas NMDA foi associado com efeitos colaterais inaceitáveis, principalmente devido ao envolvimento paradoxal deste receptor tanto na morte celular quanto na sobrevivência e plasticidade neuronal (Hardingham and Bading, 2003). Estes agentes neuroprotetores bloqueiam completamente o NMDAR, o que garante a prevenção contra a excitotoxicidade, porém culminando com prejuízos na transmissão sináptica fisiológica, que se relaciona aos numerosos efeitos indesejados (Danysz and Parsons, 2002; Muir and Lees, 1995).

A memantina (MN) é atualmente o principal fármaco empregado na clínica para o tratamento da doença de Alzheimer, por produzir uma melhora global nos aspectos comportamentais e cognitivos dos pacientes (Huang and Mucke, 2012; Peskind et al., 2006). O mecanismo de ação da MN envolve um antagonismo não-competitivo de baixa afinidade no NMDAR. Isso leva a um bloqueio parcial do influxo excessivo de cálcio decorrente do aumento de glutamato na fenda sináptica sem comprometer a atividade fisiológica da transmissão glutamatérgica (Johnson and Kotermanski, 2006). Além

disso, a MN não produz efeitos colaterais tão intensos como aqueles observados no uso de cetamina e de outros bloqueadores do NMDAR, sendo possível sua utilização eficaz e segura (Rogawski, 1993). Por essa razão nenhum outro antagonista NMDA, mas sim, a MN foi aprovada pelo FDA para o tratamento da doença de Alzheimer (Parsons et al., 2007).

Recentemente foi demonstrado que a MN na dose de 20 mg/kg diminui os níveis de glutamato cerebral, quando administrada antes, durante e após um evento isquêmico, e diminui o dano neuronal em ratos quando administrada antes do evento isquêmico (Babu and Ramanathan, 2009). A MN também foi capaz de prevenir crises convulsivas na dose de 10 mg/kg/dia durante dois dias antes da indução da crise com NMDA (Chang-Mu et al., 2010), demonstrando-se como uma importante estratégia terapêutica em diversos modelos de doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, em um modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em ratos jovens, a administração de MN na dose de 20 mg/kg foi capaz de suprimir as manifestações tônico-clônicas (Mares and Mikulecka, 2009). Embora os efeitos neuroprotetores da MN não tenham sido investigados em modelos específicos de SE até o momento, pode-se sugerir-la como uma potencial alternativa para a prevenção de crises e da morte neuronal decorrentes de eventos excitotóxicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar se a MN é capaz de atenuar a neurodegeneração induzida pelo *status epilepticus* em ratos jovens.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com MN na morte neuronal induzida pelo SE em ratos de 16 dias em diferentes regiões cerebrais, utilizando o modelo de LiCl-pilocarpina.

- Avaliar o efeito do pós-tratamento com MN na morte neuronal induzida pelo SE em ratos de 16 dias em diferentes regiões cerebrais, utilizando o modelo de LiCl-pilocarpina.

- Avaliar se existem diferenças no perfil de neuroproteção nas diferentes regiões cerebrais frente à administração de uma única dose e de múltiplas doses de MN sobre a morte neuronal induzida por LiCl-pilocarpina em ratos de 16 dias.

**PARTE II**

## **4. CAPÍTULO I**

Artigo científico a ser submetido ao periódico Epilepsia



N-methyl-D-aspartate receptor blockage by memantine protects against neuronal degeneration induced by early life LiCl-Pilocarpine-induced *status epilepticus*.

Kamila Cagliari Zenki\*<sup>1</sup>, Eduardo Kalinine<sup>1</sup>, Eduardo Rigon Zimmer<sup>1</sup>, Thainá Garbino<sup>1</sup>, Ben Hur Marins Mussulini<sup>1</sup>, Luis Valmor Cruz Portela<sup>1</sup>, Diogo Lösch de Oliveira\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.*

\* Address for correspondence:

Kamila Cagliari Zenki or Diogo Lösch de Oliveira

Department of Biochemistry – ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo

Zip code: 90035-003

Porto Alegre - RS - Brazil.

Phone: +55 51 33085555

Fax: +55 51 33085540

E-mail: [kamizenki@yahoo.com.br](mailto:kamizenki@yahoo.com.br) or [diogolosch@gmail.com](mailto:diogolosch@gmail.com)

**ABSTRACT**

*Status epilepticus* induced by LiCl-pilocarpine is accompanied by neurodegeneration and the classical antiepileptic drugs are not effective in protect neurons from death. Typical N-methyl-D-aspartate receptor antagonists exhibit anticonvulsant action and are currently able to provide neuroprotection against SE-induced neuronal death. However, these compounds have demonstrated undesirable side effects. Despite this, memantine, a low-affinity NMDA antagonist, is clinically well tolerate and does not induce side effects. Therefore, the aim of the present study was to investigate the neuroprotective effect of the memantine against neuronal degeneration induced by early life LiCl-Pilocarpine-induced *status epilepticus*. Wistar pup rats received memantine (20 mg/kg i.p.) at different treatment regimens before and after SE induction. Neurodegeneration was quantified by fluoro jade C staining. In CA1 subfield neurodegeneration was significantly decreased when animals received memantine at 0h and 0.25h post-treatment regimens. Additionally, post-treatment was able to protect against neurodegeneration in amygdala region. Memantine pre-treatment showed a reduction of cell death in thalamus. Our results demonstrated the neuroprotective effect of memantine on neuronal loss induced by SE early in life. This effect was time- and region-dependent.

**Keyword:** *status epilepticus*, excitotoxicity, neuroprotection, memantine.

## 1. Introduction

Epilepsy is a neurological disorder with highest prevalence in children and up to 80% of patients with refractory temporal lobe epilepsy, presented childhood *status epilepticus* (SE) with permanent susceptibility to future seizures (Majores et al., 2007; Raspall-Chaure et al., 2006). One of the most remarkable consequence of SE on developing brain is a massive neuronal cell death observed in specific areas, such as temporal cortex, hippocampus, amygdala and thalamus (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2002; Sankar et al., 1998). Studies performed in animal models have demonstrated that SE-induced neuronal degeneration may be related with an overactivation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) (Holopainen, 2008), since the treatment with high-affinity NMDAR antagonists, such as TCP and MK-801, has been showed to be effective into protect neurons against SE-induced cell death (Brandt et al., 2003; Lerner-Natoli et al., 1991; Stafstrom et al., 1997). Despite of the neuroprotective efficacy of NMDAR antagonists on SE-induced neurodegeneration, this effect was only achieved when drugs were administered prior or up to 15 min after pilocarpine injection (Fujikawa, 1995; Fujikawa et al., 1994; Loss et al., 2012). Moreover, several studies have failed to identify any NMDAR antagonist that was capable of attenuating SE-induced neuronal degeneration when prophylactic treatment was started 30 min after SE onset (Fujikawa, 1995; Fujikawa et al., 1994; Loss et al., 2012; Turski and Ikonomidou, 2012). In addition, from a clinical point of view, treatment with high-affinity NMDAR antagonists can induce numerous side effects for the patients, since these drugs completely block the physiological synaptic transmission when long-term therapy was required (Danysz and Parsons, 2002; Muir and Lees, 1995). The challenge of studies investigating the putative neuroprotective effects of NMDAR antagonists against SE-induced neurodegeneration will be to develop and/or

identify compounds that could prevent the pathological activation of NMDARs without disrupt the physiological role of this receptor.

In this context, memantine (MN), a dimethyl derivative of the anti-parkinson agent amantadine, has been used as an effective NMDAR open-channel blocker (Chen and Lipton, 2006). The pharmacodynamics of MN involves an uncompetitive antagonism with moderate affinity, fast blocking/unblocking kinetics and strong voltage-dependency. These characteristics culminate in a partial blockage of the NMDAR, which, in turn, does not compromise the physiological role of glutamate on synaptic transmission (Johnson and Kotermanski, 2006; Parsons et al., 2007; Rammes et al., 2008). Thus, the partial blockage of the NMDAR by MN does not generate the undesirable side effects associated with classical high-affinity NMDAR antagonist treatments, such as memory impairment (Chen and Lipton, 2006; Parsons et al., 1999; Parsons et al., 2007). Furthermore, MN, but not ketamine or MK-801, has been approved by the Food and Drug Administration to treat moderate-to-severe Alzheimer's disease (Parsons et al., 2007).

Few studies have evaluated the anticonvulsive and neuroprotective effects of MN on seizure-induced animal models. Chang-Mu *et al.* (2010) in NMDA model of seizure induction, the time latency of generalized seizures was significantly increased and decreases in mitochondrial membrane potential and mitochondrial reductase activity, all were significantly attenuated in the MN pre-treated groups with 10 mg/kg/day. In immature rats using PTZ model, the MN administration at 20 mg/kg suppressed generalized tonic-clonic seizures induced by a single PTZ injection (Mares and Mikulecka, 2009).

To date, there are no studies investigating the effects of MN treatment on SE-induced neurodegeneration. Thereby, the aim of the present study was to investigate if

MN treatment could attenuate neuronal damage induced by LiCl-pilocarpine-induced SE early in life. In addition, we also evaluated the putative protective effects of MN in pre- and post-SE treatment regimens.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Drugs**

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

### **2.2. Animals**

One hundred thirty three young Wistar rats (14 postnatal days) were obtained from local breeding. The litters were culled to 7 pups. Animals were housed under a controlled environment (light/dark photoperiod cycle of 12h, lights on at 7:00a.m), room temperature of  $21\pm 2$  °C). All procedures were approved by the Research Ethics Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number 25772).

### **2.3. Induction of *status epilepticus* and pharmacological interventions**

Rat pups (15 days old) were injected with LiCl (3mEq/kg; i.p.) 15 h prior to pilocarpine (60mg/kg; i.p.; SE group) or saline (0.9% NaCl; i.p.; Control group) (de Oliveira et al., 2008). Memantine (MN) (20 mg/kg; i.p.) was administered in SE animals at different regimens (*Fig. 1*). In the pre-treatment regimen (Pre-T groups), animals were treated at a single dose of MN (20 mg/kg; i.p.) or saline (0.9% NaCl) 6h or 3h before pilocarpine administration. In post-treatment regimen (Post-T groups), animals received a single administration of MN (20 mg/kg; i.p.) or saline (0.9% NaCl) simultaneously with pilocarpine, 0.25h, or 1h after pilocarpine administration. Another set of animals received consecutive administration of MN (20 mg/kg; i.p.) or saline (0.9% NaCl) at 0.25h, 6h, 12h and 18h after pilocarpine administration (multiple doses regimen – MD group). Rats were put in individual plastic cages during 3h for observation of seizures. Rats were allowed to spontaneously recover from SE. After SE

induction, animals were used to determine the SE-induced neuronal loss (Fluoro-Jade C staining).

#### **2.4. Fluoro-Jade C staining**

The FJC staining was performed as described by Schmued *et al.* (2005). Briefly, 24h after SE induction rats were deeply anesthetized i.p. with ketamine (90mg/kg) and xylazine (12mg/kg) and sequentially perfused through the heart with 200mL of ice-cold 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, followed by 100mL of ice-cold fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1M 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 $\mu$ m) were obtained using a Leica VT 1000S vibroslicer and mounted on to gelatin-coated slides and dried at room temperature overnight. For staining, slides were immersed in alcohol solution consisting of 1% sodium hydroxide in 80% ethanol for 5min. They were then rinsed for 2min in 70% ethanol, 2min in distilled water, and then incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10min. After rinsing with distilled water for 2min, the slides were then transferred for 10min to a 0.0001% FJC solution dissolved in 0.1% acetic acid, washed three times for 1min with distilled water, dried at room temperature overnight, dehydrated in xylene, and cover slipped. Sections were analyzed using a Nikon Eclipse E600 epifluorescence microscope.

Cell counts for FJC-positive neuronal cells were performed in coronal brain sections on representative microscopic fields corresponding to plates 31-33 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 was counted by the same software in each field (100x magnification). The total number of FJC-positive neurons for each animal was expressed as the mean of FJC-positive neurons

from three consecutive coronal sections. The brain areas were chosen accordingly to previous studies (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2002). Cells exhibiting bright green fluorescence and profiles of neuronal somas were counted while FJC-positive fragments were not counted (Wang et al., 2008). Representative figures were presented to 200x magnification.

## **2.5. Statistical analysis**

Normal distribution of data was analyzed using the D'Agostino-Pearson omnibus normality test. Since data were not normally distributed, the Mann–Whitney U-test was used to analyze the difference between groups regarding the total number of FJC-positive cells. The differences between groups were considered statistically significant if  $p < 0.05$ . Results were presented as median (interquartile range).

The Cohen's  $d$  was used to estimate the effect size, which is the difference between means divided by standard deviation. According to Cohen's  $d$ , effect size was classified as small ( $d = 0.2$ ), medium ( $d = 0.5$ ) and large ( $d \geq 0.8$ ) (Sullivan and Feinn, 2012).



### 3. Results

The behavioural pattern of LiCl-pilocarpine-treated animals correlated well with our previous description (de Oliveira et al., 2008) and was similar to the original work described by Hirsch *et al.* (1992). In all treatment regimens, MN did not alter the seizure behavioural pattern induced by LiCl-pilocarpine administration.

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 CA1 and DG hippocampal subfields, amygdala (posteroventral medial amygdaloid nucleus – MePV) and thalamus (ventral posteromedial thalamic nucleus – VPM) 24 hours after SE onset (*Fig. 2 and 3*). Treatment with MN in all regimens did not reduce the number of FJC-positive neurons in DG (*Fig. 2; Table 1*). In contrast, the number of FJC-positive cells in the CA1 subfield was significantly decreased when animals were treated with MN at 0h and 0.25h after pilocarpine injection ( $p=0.0485$  and  $p=0.0062$ , respectively, with large size effect for both) (*Fig. 2; Table 1*).

In the MePV nucleus of amygdala, MN treatment at 0.25h and 1h after pilocarpine administration reduced significantly the neuronal death ( $p=0.0081$  and  $p=0.0283$ , respectively, with large size effect for both). Moreover, this nucleus was the only region where MN showed a protective effect when administered in a multiple dose regimen ( $p=0.0485$ , with large size effect) (*Fig. 3; Table 1*).

MN administered 6 and 3h before SE induction reduced significantly the number of FJC-positive neurons only in VPM nucleus of thalamus ( $p=0.0040$  and large size effect for both). In addition, the number of FJC-positive cells was also reduced in VPM nucleus of thalamus when MN was administered 0h and 0.25h after pilocarpine injection ( $p=0.0040$ , with large size effect for both) (*Fig. 3; Table 1*).

Animals treated with saline or memantine and not submitted to SE did not present FJC-positive neurons in all regions evaluated (*Fig. 2 and 3*).

### 3. Discussion

Antiepileptic drugs, while highly effective in blocking the induction of self-sustained *status epilepticus*, failed to affect its maintenance (Mazarati et al., 1998). During SE, it seems to display the same time-dependent loss of potency displayed by most antiepileptic drugs. It is effective in the LiCl–pilocarpine model of SE when it is given before the onset of seizures, but the same dose is ineffective when given 30–60 min after the onset of seizures (George and Kulkarni, 1996; Kim et al., 2007; Morrisett et al., 1987; Sofia et al., 1993). Doubling the ketamine dose decreased tonic-clonic seizures and eliminated lethality through a 60 min observation period (Shakarjian et al., 2012). However, the combinations of ketamine and atropine are neuroprotective and reduce neuroinflammation after status epilepticus induced by the poisoning with organophosphorus nerve agents in mice (Dhote et al., 2012). McLean *et.al.*, (1992) demonstrated protective efficacy of MN against seizures produced by a single sublethal injection of soman in rats: therapeutic administration of MN (15 min after soman injection) stopped seizure activity within about 30-60 min; eliminated excessive salivation and reduced seizure intensity from Stage 5 to Stage 0. MN has multiple mechanisms of actions which could have contributed to the protection observed (McLean et al., 1992), but the protection against neurodegeneration by MN has not been demonstrate at post-treatment regimens of SE models.

The excitotoxicity caused by excessive neuronal stimulation, with subsequent calcium entry into the neuron, may occur in any brain region containing NMDAR (Choi, 1992). LiCl-pilocarpine administration disrupts neuron-glia signalling via glial glutamate uptake and reducing  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity (de Oliveira et al., 2011), which may cause an increase of glutamate levels in synaptic cleft with excessive activation of NMDAR and lead neuron to excitotoxicity-dependent death are related to  $\text{Ca}^{2+}$  influx

trough NMDAR composed by NR1/NR2B subunits (Rothman and Olney, 1995; Yan et al., 2013). During development, especially during postnatal days 7–15, the rat brain exhibits enhanced susceptibility to the toxic effects of modulation of the NMDAR system and has been suggested as deriving from the increased expression of specific NMDAR subunits (Haberny et al., 2002). In this work, the use of MN has shown to protect neurons against SE-induced toxicity at spatio-temporal mode in immature brain and may be associated with differences of NMDAR subunits expression around the brain.

The developing brain has high expression of NR2A and NR2B subunits in hippocampus (Monyer et al., 1994; Paoletti et al., 2013). The neuroprotective effect of MN observed in CA1 can be related to binding in both subunits, because this drug was equipotent against glutamate-induced currents in NR2A and NR2B receptors expressed in HEK-293 cells (Bresink et al., 1996) and *X. oocytes* (Parsons et al., 1999). Indeed, distinct effect observed in VPM corroborate to this hypothesis, because the MN binding undergoes changes due to compositional differences in NMDAR. The expression of NMDAR in the thalamus of an immature brain is more heterogeneous, in which it is possible to verify the presence of NR1/NR2A, NR1/NR2B and NR1/NR2D (Paoletti et al., 2013) and MN is able to interact with all of these receptors (Parsons et al., 2007). Surprisingly, all board of post-treatment with MN was protectors in the amygdala. Data have shown that infusion of the selective NR2B antagonist into the amygdala disrupts the acquisition of fear conditioning (Rodrigues et al., 2001). In this region, NR2 subunit expression is developmentally regulated such that at birth NR2B is the predominant subunit, and has been elucidated a large expression and crucial role in synaptic functionality of this subunit at first weeks of life (Lopez de Armentia and Sah, 2003). The neuroprotective effect of MN observed in MePV can be related to increased

selectivity binding in NR2B. Probably, the greater availability of this subunit could influence the selectivity of binding of the drug, in view of MN present high affinity for NR1/NR2B receptors (Grimwood et al., 1996).

In summary, our results demonstrated the neuroprotective effect of MN administration in SE-induced neuronal loss through distinct target sites evidenced by time- and structure- variation effect. Therefore, MN treatment can provide a pharmacological tool for excitotoxicological events in early life period. However, its important evaluates the safety of MN administration in young rats.

## References

1. Brandt C, Potschka H, Loscher W, et al. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2003;118:727-740.
2. Bresink I, Benke TA, Collett VJ, et al. Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:195-204.
3. Chang-Mu C, Jen-Kun L, Shing-Hwa L, et al. Characterization of neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice. *Behav Neurosci* 2010;124:541-553.
4. Chen HS, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 2006;97:1611-1626.
5. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992;23:1261-1276.
- Danzysz W, Parsons CG. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotox Res* 2002;4:119-126.
6. de Oliveira DL, Bavaresco C, Mussulini BH, et al. Early life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus reduces acutely hippocampal glutamate uptake and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity. *Brain Res* 2011;1369:167-172.
7. de Oliveira DL, Fischer A, Jorge RS, et al. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia* 2008;49:842-852.
8. Dhote F, Carpentier P, Barbier L, et al. Combinations of ketamine and atropine are neuroprotective and reduce neuroinflammation after a toxic status epilepticus in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;259:195-209.
9. Fujikawa DG. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 1995;36:186-195.
10. Fujikawa DG, Daniels AH, Kim JS. The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protects against status epilepticus-induced neuronal damage. *Epilepsy Res* 1994;17:207-219.
11. George B, Kulkarni SK. Protective effects of GABAergic drugs and other anticonvulsants in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1996;18:335-340.
12. Grimwood S, Gilbert E, Ragan CI, et al. Modulation of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx into cells stably expressing recombinant human NMDA receptors by ligands acting at distinct recognition sites. *J Neurochem* 1996;66:2589-2595.
13. Haberny KA, Paule MG, Scallet AC, et al. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci* 2002;68:9-17.
14. Hirsch E, Baram TZ, Snead OC, 3rd. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 1992;583:120-126.
15. Holopainen IE. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem Int* 2008;52:935-947.
16. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:61-67.
17. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y, et al. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia* 2007;48 Suppl 5:19-26.
18. Kubova H, Druga R, Haugvicova R, et al. Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat. *Epilepsia* 2002;43 Suppl 5:54-60.
19. Lerner-Natoli M, Rondouin G, Belaidi M, et al. N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]-piperidine (TCP) does not block kainic acid-induced status epilepticus but reduces secondary hippocampal damage. *Neurosci Lett* 1991;122:174-178.
20. Lopez de Armentia M, Sah P. Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci* 2003;23:6876-6883.

21. Loss CM, Cordova SD, de Oliveira DL. Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 2012;1474:110-117.
22. Majores M, Schoch S, Lie A, et al. Molecular neuropathology of temporal lobe epilepsy: complementary approaches in animal models and human disease tissue. *Epilepsia* 2007;48 Suppl 2:4-12.
23. Mares P, Mikulecka A. Different effects of two N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on seizures, spontaneous behavior, and motor performance in immature rats. *Epilepsy Behav* 2009;14:32-39.
24. Mazarati AM, Baldwin RA, Sankar R, et al. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res* 1998;814:179-185.
25. McLean MJ, Gupta RC, Dettbarn WD, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of memantine against seizures produced by soman in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112:95-103.
26. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994;12:529-540.
27. Morrisett RA, Jope RS, Snead OC, 3rd. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Experimental Neurology* 1987;97:193-200.
28. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 1995;26:503-513.
29. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:383-400.
30. Parsons CG, Danysz W, Bartmann A, et al. Amino-alkyl-cyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. *Neuropharmacology* 1999;38:85-108.
31. Parsons CG, Stoffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 2007;53:699-723.
32. Rammes G, Danysz W, Parsons CG. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr Neuropharmacol* 2008;6:55-78.
33. Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, et al. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5:769-779.
34. Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 2001;21:6889-6896.
35. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995;18:57-58.
36. Sankar R, Shin DH, Liu H, et al. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci* 1998;18:8382-8393.
37. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005;1035:24-31.
38. Shakarjian MP, Veliskova J, Stanton PK, et al. Differential antagonism of tetramethylenedisulfotetramine-induced seizures by agents acting at NMDA and GABA(A) receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;265:113-121.
39. Sofia RD, Gordon R, Gels M, et al. Effects of felbamate and other anticonvulsant drugs in two models of status epilepticus in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;79:335-341.
40. Stafstrom CE, Tandon P, Hori A, et al. Acute effects of MK801 on kainic acid-induced seizures in neonatal rats. *Epilepsy Res* 1997;26:335-344.
41. Sullivan GM, Feinn R. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* 2012;4:279-282.

42. Turski CA, Ikonomidou C. Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs. *Front Neurol* 2012;3:120.
43. Wang L, Liu YH, Huang YG, et al. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res* 2008;1241:157-167.
44. Yan D, Yamasaki M, Straub C, et al. Homeostatic control of synaptic transmission by distinct glutamate receptors. *Neuron* 2013;78:687-699.



**Table 1. Number of Fluoro Jade-C positive cells in different brain regions of SE-induced animals treated with saline or memantine.**

Brain region	Treatment regimen	SAL+PILO	MN+PILO	Cohen's <i>d</i>	Statistical difference
CA1	Pre-T 6h	16 (14:20)	17 (4:24)	0.103	n.s.
	Pre-T 3h	14 (10:19)	9 (6:12)	1.272	n.s.
	Co-T 0h	12 (8:14)	6 (3:8)	1.334	p=0.0485
	Post-T 0.25h	13 (11:16)	6 (2:9)	2.162	p=0.0062
	Post-T 1h	16 (15:21)	18 (14:27)	-0.434	n.s.
	Post-T MD	15 (9:24)	9 (7:11)	1,051	n.s.
DG	Pre-T 6h	12.5±5.26	11 (9:18)	-0.327	n.s.
	Pre-T 3h	15.0±6.68	14 (9:22)	0.669	n.s.
	Co-T 0h	15.0±3.56	16 (11:18)	0.692	n.s.
	Post-T 0.25h	13.0±3.74	14 (9:17)	-0.474	n.s.
	Post-T 1h	13.0±8.76	11 (6:22)	-0.053	n.s.
	Post-T MD	14.25±5.56	14 (9:20)	-0.453	n.s.
MePV	Pre-T 6h	266 (217:284)	281 (201:361)	-0.608	n.s.
	Pre-T 3h	269 (149:400)	201 (154:298)	0.493	n.s.
	Co-T 0h	272 (193:304)	247 (169:410)	-0.321	n.s.
	Post-T 0.25h	325 (161: 425)	43 (0:107)	2.278	p=0.0081
	Post-T 1h	274 (194:415)	49 (18:203)	2.160	p=0.0283
	Post-T MD	267 (169:389)	32 (8:196)	1.831	p=0.0485
VPM	Pre-T 6h	114 (92:120)	72 (53:79)	2.798	p=0.0040
	Pre-T 3h	125 (104:132)	46 (40:54)	6.180	p=0.0040
	Co-T 0h	113 (91:166)	41 (25:55)	2.844	p=0.0040
	Post-T 0.25h	102 (81:137)	19 (0:63)	2.459	p=0.0040
	Post-T 1h	113 (78:159)	49 (18:138)	0.533	n.s.
	Post-T MD	157 (91:195)	41 (27:130)	1.114	n.s.

Data were expressed as median (interquartile range).

**Figure legends**

**Figure 1.** Experimental design of the treatment regimens.

**Figure 2.** Representative images of the MN effect on SE-induced neuronal degeneration in hippocampal CA1 and dentate gyrus (DG). FJC-positive cells were quantified 24 hours after administration of LiCl-pilocarpine. Images are at 200x magnification.

**Figure 3.** Representative images of the MN effects on SE-induced neuronal degeneration. MePV: posteroventral medial amygdaloid nucleus; VPM: ventral posteromedial thalamic nucleus. FJC-positive cells were quantified 24 hours after administration of LiCl-pilocarpine. Images are at 200x magnification.

Figure 1.

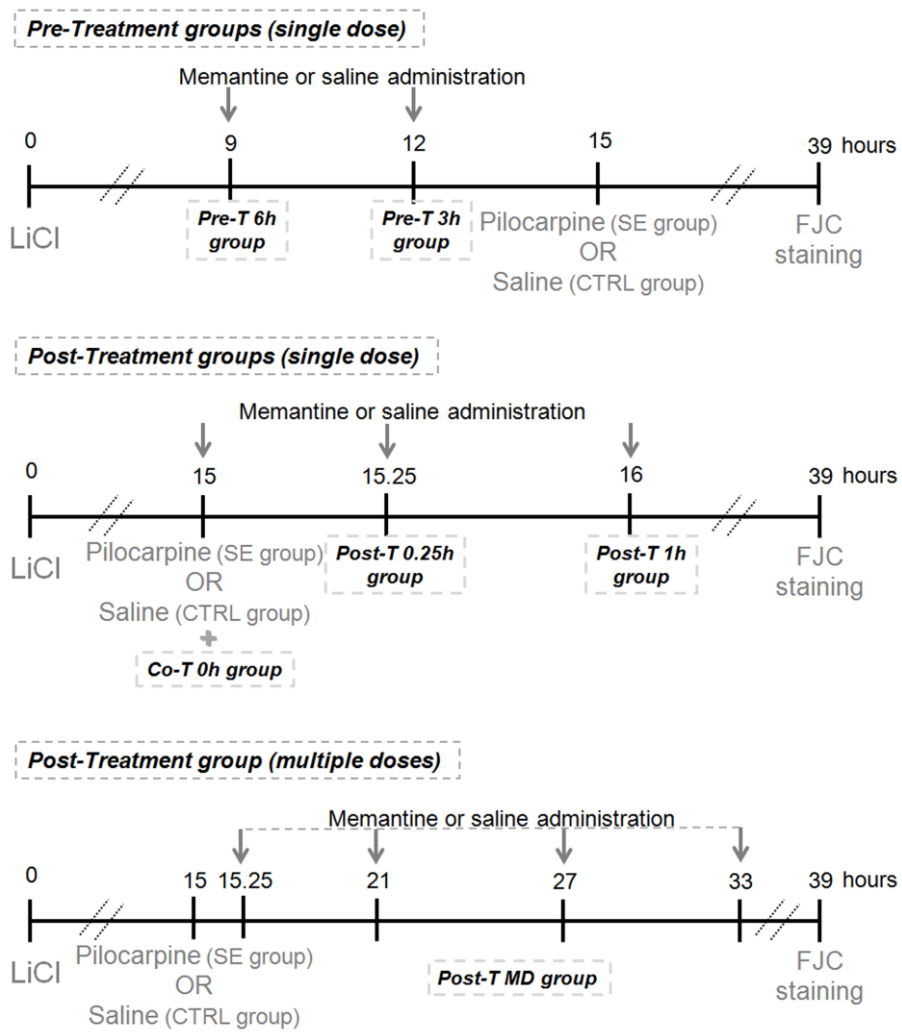


Figure 2.

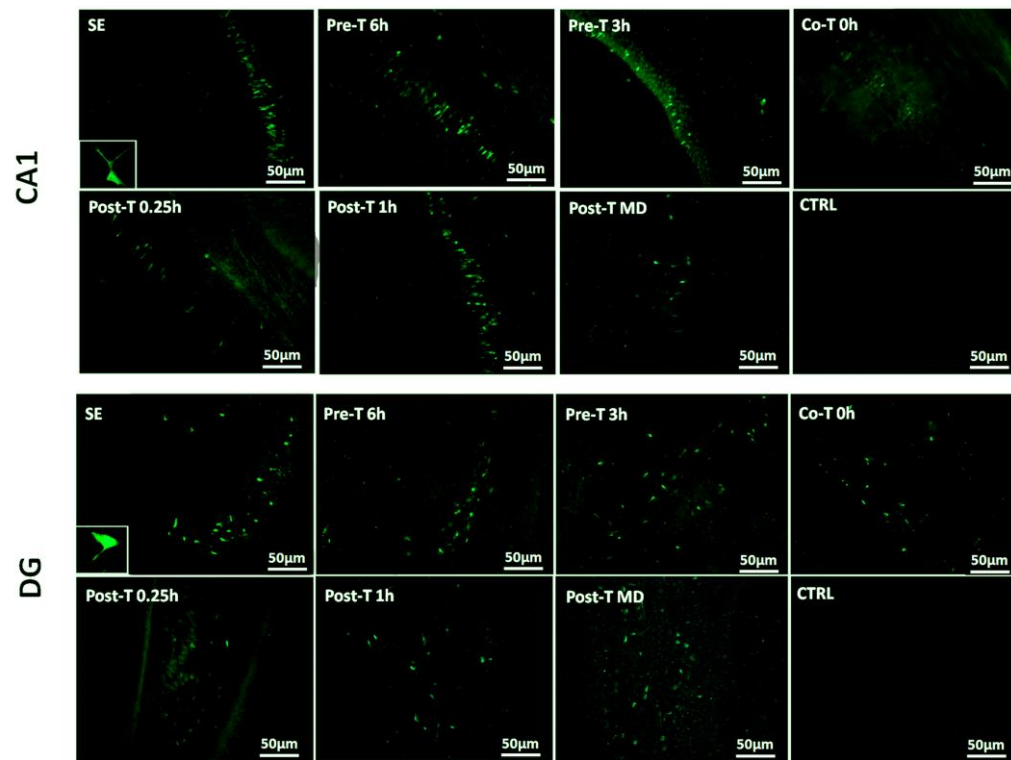
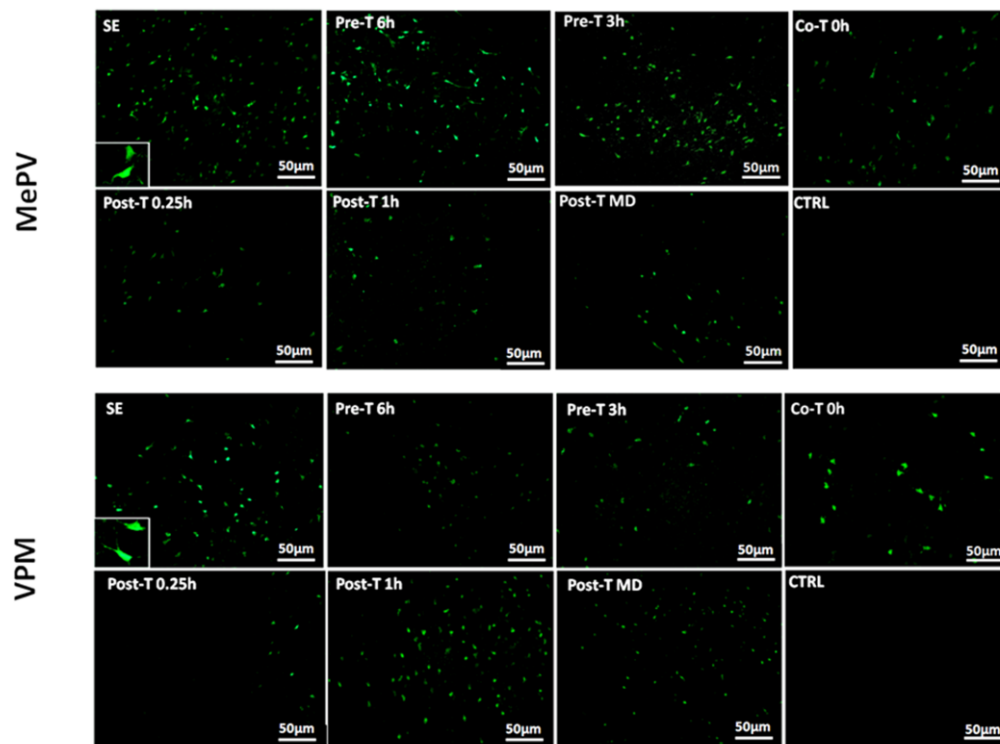


Figure 3.



**PARTE III**

## 5. DISCUSSÃO

A maioria dos fármacos antiepilépticos são eficazes em bloquear a auto-sustentação do *status epilepticus* (SE), conseguindo desta forma, interromper a crise convulsiva. Porém muitos deles falham na manutenção das crises *pós-status*, sendo comum a utilização de esquemas terapêuticos complexos para esta finalidade (Mazarati *et al.*, 1998). Além disso, a maioria dos antiepilépticos administrados durante o SE, parecem demonstrar uma perda de potência tempo-dependente, ou seja, quanto mais tempo decorre entre o início da crise e a administração do fármaco, menor seu efeito. Isto pode ser observado na clínica, e translacionalmente em modelos animais, onde os fármacos que são eficazes contra o SE quando administrados antes do início das convulsões, são ineficazes quando administrados 30-60 min após o início de convulsões (George and Kulkarni, 1996; Kim *et al.*, 2007; Morrisett *et al.*, 1987; Sofia *et al.*, 1993). Assim, mesmo diante do vasto conhecimento atual acerca de terapias antiepilépticas, torna-se emergente a investigação de fármacos mais eficazes no pós-tratamento.

Atualmente, um dos principais alvos de estudo para novas estratégias de tratamento das crises convulsivas são os antagonistas dos NMDARs. Neste contexto, a cetamina mostrou diminuir crises tônico-clônicas e atenuar a letalidade do modelo animal (Shakarjian *et al.*, 2012), e a combinação de cetamina e atropina possui efeito neuroprotetor e reduz a neuroinflamação após o SE induzido pelo envenenamento com organofosforados (Dhote *et al.*, 2012). McLean e colaboradores (1992) demonstraram um efeito protetor da MN contra convulsões induzidas por uma única injeção de *soman* em ratos: a administração terapêutica da MN (15 min após a injeção de *soman*) parou a atividade convulsiva dentro de 30-60 minutos, eliminando a salivação excessiva e reduzindo a intensidade das crises do estágio 5 para o 0. A MN tem vários mecanismos de ação que podem ter contribuído para a proteção observada, (McLean *et al.*, 1992), entretanto a proteção contra a neurodegeneração por MN não foi demonstrada no pós-tratamento.

Resultados na literatura já mostraram que o efeito neuroprotetor pode ser resultado das propriedades anticonvulsivantes, muito embora, na maioria das terapias convencionais para o tratamento das crises, os efeitos neuroprotetores não sejam comumente observados (Velisek and Veliskova, 2008). Tendo em mente que efeitos anticonvulsivos e efeitos neuroprotetores não são sinônimos, uma terapia anticonvulsiva sintomática que previna a morte neuronal, ou a combinação da terapia

neuroprotetora com uma anti-convulsivante perfazem a melhor abordagem farmacológica para o tratamento da epilepsia. Estudos em modelos animais demonstram que o SE no cérebro em desenvolvimento causa uma morte neuronal expressiva em diversas regiões como hipocampo, córtex, amígdala e tálamo (de Oliveira et al., 2011; Kubova et al., 2004; Sankar et al., 1998), e que esta neurodegeneração está associada com a hiperestimulação dos NMDARs (Holopainen, 2008), fato que justifica a ampla investigação acerca de novos tratamentos para crises convulsivas utilizando antagonistas NMDA. Assim, a excitotoxicidade neuronal causada pela estimulação excessiva das sinapses glutamatérgicas, culminando com a entrada exacerbada de cálcio no neurônio, pode ocorrer em qualquer região do cérebro contendo NMDAR (Choi, 1992). Adicionalmente, a administração LiCl-pilocarpina perturba a comunicação neurônio-glia, através da diminuição da captação de glutamato glial e da redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (de Oliveira *et al.*, 2011), o que pode causar um aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica com a ativação excessiva dos NMDARs. Isto pode explicar o papel central do neurônio na excitotoxicidade relacionada com influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos NMDARs compostos por subunidades NR1/NR2B (Rothman and Olney, 1995; Yan *et al.*, 2013). Durante o desenvolvimento, especialmente durante 7-15 dias após o nascimento, a maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos frente à modulação do sistema NMDAR é sugerida como proveniente do aumento da expressão de subunidades específicas dos NMDAR (Haberny *et al.*, 2002).

No nosso estudo, a administração de MN mostrou um efeito protetor contra a morte neuronal associada ao SE de modo espaço-temporal no cérebro imaturo, que pode se relacionar com as diferenças de expressão das subunidades NMDAR em todo o cérebro. O cérebro em desenvolvimento possui alta expressão das subunidades NR2A e NR2B no hipocampo (Monyer *et al.*, 1994; Paoletti *et al.*, 2013). O efeito neuroprotetor da MN em CA1 pode ser relacionado com a ligação em ambas às subunidades, uma vez que ela se mostrou igualmente eficaz contra as correntes induzidas pelo glutamato em células HEK-293 (Bresink *et al.*, 1996) e oócitos de *xenopus* (Parsons *et al.*, 1999), ambos ricos em subunidades NR2A e NR2B. O perfil de neuroproteção distinto observado em VPM corrobora com esta hipótese, porque a ligação da MN, e seu consequente efeito neuroprotetor, sofrem alterações devido às diferenças de composição dos NMDARs. A expressão do NMDAR no tálamo de um cérebro imaturo é mais heterogênea, em que é possível verificar a presença de NR1/NR2A, NR1/NR2B e NR1/NR2D (Paoletti *et al.*, 2013), e sabendo-se que a MN é capaz de interagir com todos



estes sub-tipos de NMDARs (Parsons *et al.*, 2007), é possível compreender a distinção de suas propriedades farmacológicas em cada região cerebral. Surpreendentemente, em todas as abordagens de pós-tratamento que testamos a MN foi neuroprotetora na amígdala. Os dados de Rodrigues e colaboradores (2001) demonstraram que a infusão de um antagonista seletivo para NR2B na amígdala interrompe a aquisição do medo condicionado (Rodrigues *et al.*, 2001). Nesta região cerebral, a expressão da subunidade NR2 é regulada pelo desenvolvimento de tal modo que, ao nascimento é a NR2B a subunidade predominante, e que sua vasta expressão possui um papel crucial na funcionalidade sináptica desta subunidade nas primeiras semanas de vida (Lopez de Armentia and Sah, 2003). O efeito neuroprotetor de MN em MePV que observamos pode estar relacionado com uma maior seletividade na ligação da MN à subunidade NR2B. Provavelmente, a maior disponibilidade desta subunidade pode influenciar a seletividade de ligação do fármaco, tendo em vista que a MN apresenta elevada afinidade para NMDAR contendo NR1/NR2B (Grimwood *et al.*, 1996).

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstram o efeito neuroprotetor da administração MN na morte neuronal associada ao SE através de sítios-alvo distintos evidenciado pela variação de efeitos tempo e estrutura – dependentes. Portanto, o tratamento com MN pode fornecer uma ferramenta farmacológica para eventos excitotóxicos nos períodos iniciais de desenvolvimento encefálico.

## 7. REFERÊNCIAS

- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1994. 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.
- Al-Mufti, F., Claassen, J., 2014. Neurocritical care: status epilepticus review. *Crit Care Clin* 30, 751-764.
- Anggono, V., Huganir, R. L., 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 22, 461-469.
- Ashcroft, F. M., 2006. From molecule to malady. *Nature* 440, 440-447.
- Babu, C. S., Ramanathan, M., 2009. Pre-ischemic treatment with memantine reversed the neurochemical and behavioural parameters but not energy metabolites in middle cerebral artery occluded rats. *Pharmacol Biochem Behav* 92, 424-432.
- Bak, L. K., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98, 641-653.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A., 2001. *Neuroscience : exploring the brain*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Bergles, D. E., Diamond, J. S., Jahr, C. E., 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9, 293-298.
- Bigge, C. F., 1993. Structural requirements for the development of potent N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* 45, 1547-1561.
- Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W., Ebert, U., 2003. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 118, 727-740.
- Bresink, I., Benke, T. A., Collett, V. J., Seal, A. J., Parsons, C. G., Henley, J. M., Collingridge, G. L., 1996. Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 119, 195-204.
- Chang-Mu, C., Jen-Kun, L., Shing-Hwa, L., Shoen-Yn, L. S., 2010. Characterization of neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice. *Behav Neurosci* 124, 541-553.
- 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., Zhang, D., 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793-798.
- Chen, H. S., Lipton, S. A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97, 1611-1626.
- Choi, D. W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7, 369-379.

- Choi, D. W., 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23, 1261-1276.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8, 185-196.
- Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C., Zorumski, C. F., 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23, 953-968.
- Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ganong, A. H., 1988. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11, 61-80.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11, 327-335.
- Danbolt, N. C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- Danzysz, W., Parsons, C. G., 2002. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotox Res* 4, 119-126.
- de Oliveira, D. L., Bavaresco, C., Mussulini, B. H., Fischer, A., Souza, D. O., Wyse, A. T., Wofchuk, S., 2011. Early life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus reduces acutely hippocampal glutamate uptake and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity. *Brain Res* 1369, 167-172.
- 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.
- Dhote, F., Carpentier, P., Barbier, L., Peinnequin, A., Baille, V., Pernot, F., Testylier, G., Beaup, C., Foquin, A., Dorandeu, F., 2012. Combinations of ketamine and atropine are neuroprotective and reduce neuroinflammation after a toxic status epilepticus in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 259, 195-209.
- 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* 42, 482-495.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Elger, C. E., Schmidt, D., 2008. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav* 12, 501-539.
- Engel, J., Jr., 2001a. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia* 42 Suppl 6, 3.
- Engel, J., Jr., 2001b. 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.
- Fan, X., Jin, W. Y., Wang, Y. T., 2014. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci* 8, 160.

- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Gonzalez-Castaneda, R. E., Beas-Zarate, C., 2012. [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia* 27, 301-310.
- Fujikawa, D. G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36, 186-195.
- Fujikawa, D. G., Daniels, A. H., Kim, J. S., 1994. The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protects against status epilepticus-induced neuronal damage. *Epilepsy Res* 17, 207-219.
- George, B., Kulkarni, S. K., 1996. Protective effects of GABAergic drugs and other anticonvulsants in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18, 335-340.
- Grimwood, S., Gilbert, E., Ragan, C. I., Hutson, P. H., 1996. Modulation of  $45\text{Ca}^{2+}$  influx into cells stably expressing recombinant human NMDA receptors by ligands acting at distinct recognition sites. *J Neurochem* 66, 2589-2595.
- Haberny, K. A., Paule, M. G., Scallet, A. C., Sistare, F. D., Lester, D. S., Hanig, J. P., Slikker, W., Jr., 2002. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci* 68, 9-17.
- Hardingham, G. E., Bading, H., 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26, 81-89.
- 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.
- Henneberger, C., Bard, L., King, C., Jennings, A., Rusakov, D. A., 2013. NMDA receptor activation: two targets for two co-agonists. *Neurochem Res* 38, 1156-1162.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I., Philpot, B. D., 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91, 23-37.
- Hirsch, E., Baram, T. Z., Snead, O. C., 3rd, 1992. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 583, 120-126.
- Hoffman, G. E., Moore, N., Fiskum, G., Murphy, A. Z., 2003. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Experimental Neurology* 182, 124-134.
- 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.
- Huang, Y., Mucke, L., 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148, 1204-1222.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., 1997. 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.
- Johnson, J. W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-531.

- Johnson, J. W., Kotermanski, S. E., 2006. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 6, 61-67.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., 2013. *Principles of neural science*. McGraw-Hill, New York, NY ; London.
- Kemp, J. A., Leeson, P. D., 1993. The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol Sci* 14, 20-25.
- Kim, J. S., Kondratyev, A., Tomita, Y., Gale, K., 2007. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia* 48 Suppl 5, 19-26.
- Kubova, H., Druga, R., Haugvicova, R., Suchomelova, L., Pitkanen, A., 2002. Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat. *Epilepsia* 43 Suppl 5, 54-60.
- Kubova, H., Druga, R., Lukasiuk, K., Suchomelova, L., Haugvicova, R., Jirmanova, I., Pitkanen, A., 2001. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci* 21, 3593-3599.
- 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.
- Lerner-Natoli, M., Rondouin, G., Belaidi, M., Baldy-Moulinier, M., Kamenka, J. M., 1991. N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]-piperidine (TCP) does not block kainic acid-induced status epilepticus but reduces secondary hippocampal damage. *Neurosci Lett* 122, 174-178.
- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H., Raymond, L. A., 2002. Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 5, 833-834.
- Lopez de Armentia, M., Sah, P., 2003. Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci* 23, 6876-6883.
- 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, 110-117.
- Low, C. M., Wee, K. S., 2010. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol* 78, 1-11.
- Lucas, D. R., Newhouse, J. P., 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58, 193-201.
- Majores, M., Schoch, S., Lie, A., Becker, A. J., 2007. Molecular neuropathology of temporal lobe epilepsy: complementary approaches in animal models and human disease tissue. *Epilepsia* 48 Suppl 2, 4-12.
- 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, 32-39.
- Mathern, G. W., Adelson, P. D., Cahan, L. D., Leite, J. P., 2002. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 135, 237-251.

- Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Babb, T. L., 1995. 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.
- Matsui, K., Jahr, C. E., Rubio, M. E., 2005. High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci* 25, 7538-7547.
- Mazarati, A. M., Baldwin, R. A., Sankar, R., Wasterlain, C. G., 1998. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res* 814, 179-185.
- McDonald, J. W., Johnston, M. V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15, 41-70.
- McDonough, J. H., Jr., Shih, T. M., 1997. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 559-579.
- McKenna, M. C., 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85, 3347-3358.
- McKenna, M. C., 2013. Glutamate pays its own way in astrocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 191.
- McLean, M. J., Gupta, R. C., Dettbarn, W. D., Wamil, A. W., 1992. Prophylactic and therapeutic efficacy of memantine against seizures produced by soman in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 95-103.
- McNamara, J. O., 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14, 3413-3425.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P. L., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698, 6-18.
- Meyer, A., Falconer, M. A., Beck, E., 1954. Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17, 276-285.
- Minami, N., Morino, M., Uda, T., Komori, T., Nakata, Y., Arai, N., Kohmura, E., Nakano, I., 2014. Surgery for amygdala enlargement with mesial temporal lobe epilepsy: pathological findings and seizure outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Monaghan, D. T., Cotman, C. W., 1985. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5, 2909-2919.
- Monaghan, D. T., Jane, D. E., 2009. *Pharmacology of NMDA Receptors*.
- 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, 529-540.
- Morrisett, R. A., Jope, R. S., Snead, O. C., 3rd, 1987. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Experimental Neurology* 97, 193-200.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D.,

Rogawski, M. A., Snyder, S. H., 2000. 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.

Muir, K. W., Lees, K. R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503-513.

Nairismagi, J., Pitkanen, A., Kettunen, M. I., Kauppinen, R. A., Kubova, H., 2006. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia* 47, 479-488.

Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A. J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3, 748-755.

Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G., Knopfel, T., 1996. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19, 267-271.

Ogden, K. K., Traynelis, S. F., 2011. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 32, 726-733.

Olney, J. W., 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.

Paoletti, P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33, 1351-1365.

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.

Parsons, C. G., Danysz, W., Bartmann, A., Spielmanns, P., Frankiewicz, T., Hesselink, M., Eilbacher, B., Quack, G., 1999. Amino-alkyl-cyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. *Neuropharmacology* 38, 85-108.

Parsons, C. G., Stoffler, A., Danysz, W., 2007. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53, 699-723.

Perrais, D., Veran, J., Mulle, C., 2010. Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. *Trends Pharmacol Sci* 31, 516-522.

Peskind, E. R., Potkin, S. G., Pomara, N., Ott, B. R., Graham, S. M., Olin, J. T., McDonald, S., 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 14, 704-715.

Prybylowski, K., Wenthold, R. J., 2004. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem* 279, 9673-9676.

Rammes, G., Danysz, W., Parsons, C. G., 2008. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr Neuropharmacol* 6, 55-78.

Rao, V. R., Finkbeiner, S., 2007. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci* 30, 284-291.



- Raspall-Chaure, M., Chin, R. F., Neville, B. G., Scott, R. C., 2006. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5, 769-779.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research* 140, 1-47.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., LeDoux, J. E., 2001. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21, 6889-6896.
- Rogawski, M. A., 1993. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 14, 325-331.
- Rothman, S. M., Olney, J. W., 1995. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 18, 57-58.
- Sanacora, G., Zarate, C. A., Krystal, J. H., Manji, H. K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7, 426-437.
- 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.
- 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.
- Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J., Sonnewald, U., 1997. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21, 99-105.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122, 1-29.
- Shakarjian, M. P., Veliskova, J., Stanton, P. K., Velisek, L., 2012. Differential antagonism of tetramethylenedisulfotetramine-induced seizures by agents acting at NMDA and GABA(A) receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 265, 113-121.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N., Jan, L. Y., 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144-147.
- Sirven, J. I., Waterhouse, E., 2003. Management of status epilepticus. *Am Fam Physician* 68, 469-476.
- Sofia, R. D., Gordon, R., Gels, M., Diamantis, W., 1993. Effects of felbamate and other anticonvulsant drugs in two models of status epilepticus in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 79, 335-341.
- Stafstrom, C. E., Tandon, P., Hori, A., Liu, Z., Mikati, M. A., Holmes, G. L., 1997. Acute effects of MK801 on kainic acid-induced seizures in neonatal rats. *Epilepsy Res* 26, 335-344.
- Sullivan, G. M., Feinn, R., 2012. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* 4, 279-282.

Turski, C. A., Ikonomidou, C., 2012. Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs. *Front Neurol* 3, 120.

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.

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

Velisek, L., Veliskova, J., 2008. New avenue of research: antiepileptic drug and estradiol neuroprotection in epilepsy. *Recent Pat CNS Drug Discov* 3, 128-137.

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.

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

Yan, D., Yamasaki, M., Straub, C., Watanabe, M., Tomita, S., 2013. Homeostatic control of synaptic transmission by distinct glutamate receptors. *Neuron* 78, 687-699.

Yin, S., Niswender, C. M., 2014. Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell Signal* 26, 2284-2297.