

# Receptores NMDA contendo subunidade GluN2B estão envolvidos na neurodegeneração e ativação microglial causados pela indução de *status epilepticus* por LiCl-

## pilocarpina em ratos jovens

Natã Ezequiel Sehn da Rosa, Diogo Losch de Oliveira

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre



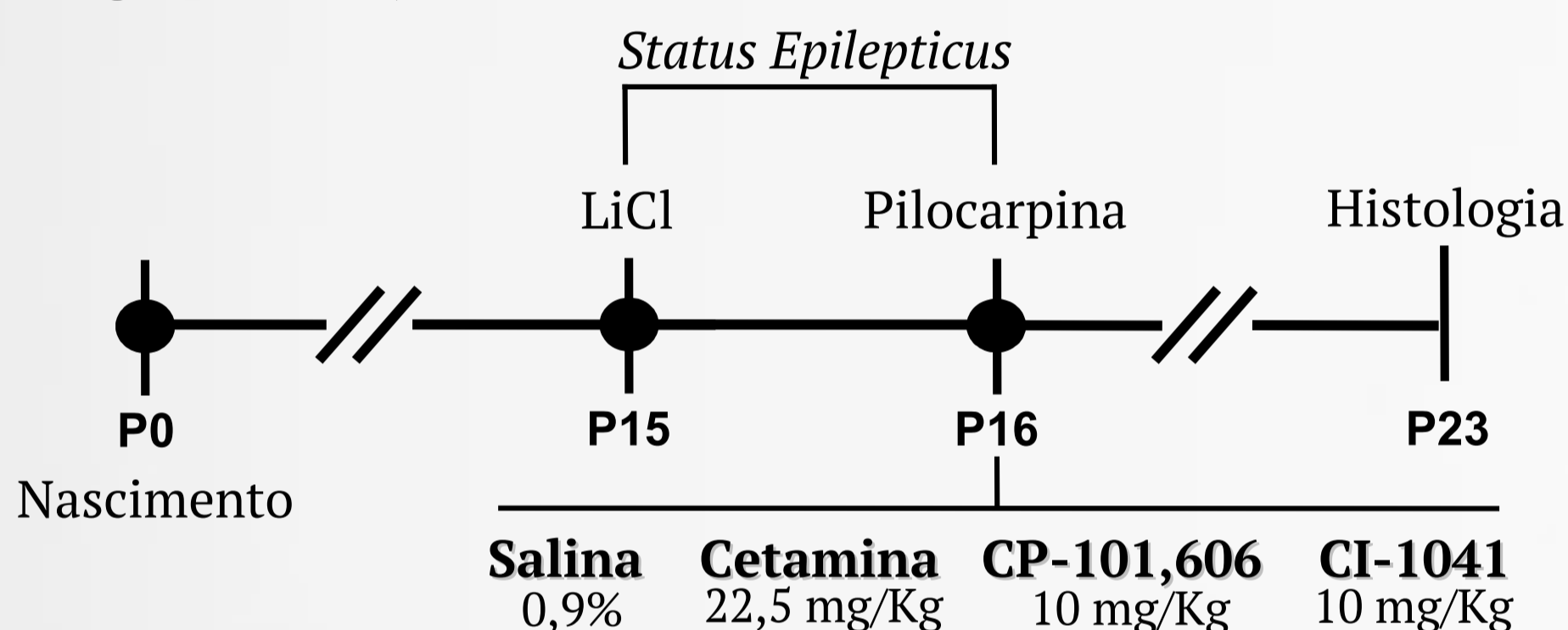
### Introdução

O *status epilepticus* (SE) é definido como uma ou mais crises epiléticas sem recuperação da consciência com duração de 30 minutos ou mais.<sup>[1]</sup> O SE, quando ocorrido durante períodos críticos de desenvolvimento encefálico, pode causar danos neurológicos, os quais muitas vezes são irreversíveis. Esses danos estão frequentemente associados à excitotoxicidade mediada por receptores glutamatergicos do tipo NMDA (NMDAR)<sup>[2]</sup>, que pode resultar em neurodegeneração e inflamação encefálicas.

Alguns trabalhos têm sugerido que as diferentes combinações de subunidades dos NMDAR estão envolvidas de diferentes maneiras nesses eventos excitotóxicos do SE. Portanto, nesse trabalho, nosso objetivo foi investigar o envolvimento da subunidade GluN2B (através da administração dos antagonistas seletivos de NMDAR contendo a subunidade GluN2B, CP-101,606 e CI-1041) sobre a neurodegeneração e ativação microglial induzida pelo SE em ratos jovens.

### Materiais e Métodos

O *status epilepticus*: ratos wistar machos, com 16 dias de vida, foram submetidos ao SE. No 16º dia de vida os animais receberam uma injeção de pilocarpina (60 mg/Kg, i.p.), 18 horas após a injeção de LiCl (3 mEq/Kg, i.p.)<sup>[3]</sup>. Quinze minutos após a injeção de pilocarpina os animais foram tratados com salina (Sal - grupo SE+Sal); Cetamina (Cet - grupo SE+Cet); CP-101,606 (CP - grupo SE+CP) ou CI-1041 (CI - grupo SE+CI).



Sete dias após a indução do SE, os animais foram anestesiados, perfundidos e seus cérebros removidos para avaliação histológica na região CA1 do hipocampo (CA1), no núcleo talâmico ventro medial (VM) e no núcleo medial póstero-ventral da amígdala (MePV). Foram realizadas as técnicas:

- Fluoro-Jade C: avalia neurodegeneração.
- Cresil Violeta: marcação de Corpúsculo de Nissl.
- Imunofluorescência para Iba1 e ED1: avalia recrutamento e ativação microglial.

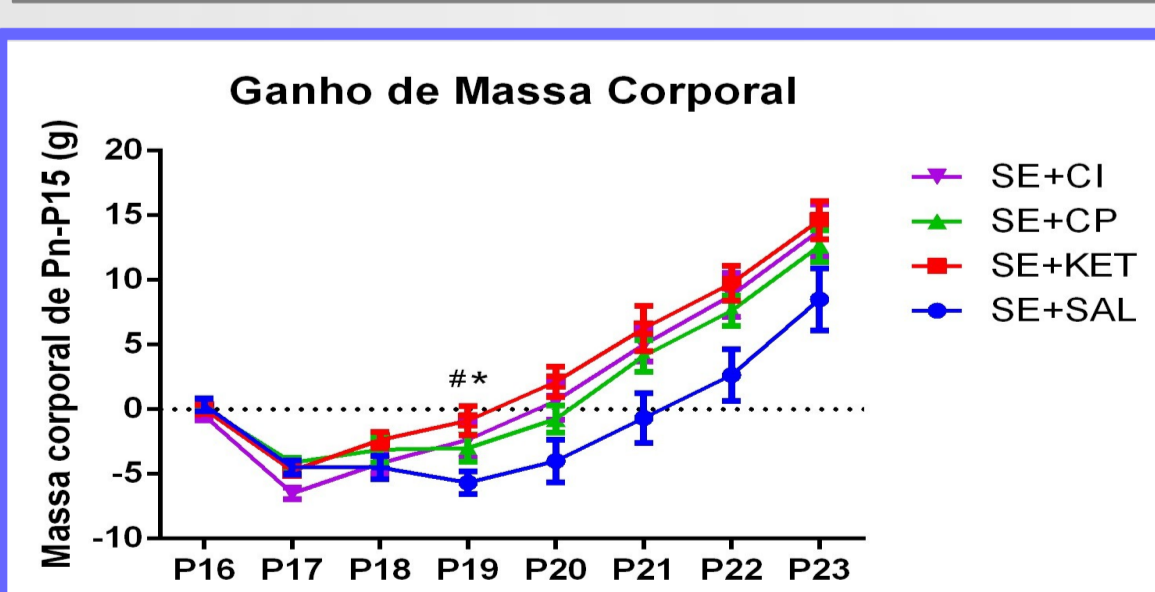
### Resultados Parciais

#### Padrão Convulsivo

O *status epilepticus* foi caracterizado por automatismos orofaciais contínuos, salivação, mastigação, clonismo dos membros anteriores, perda de reflexo de endireitamento e queda<sup>[5]</sup>. O tratamento com cetamina diminuiu a intensidade das manifestações motoras, as quais cessaram após aproximadamente 5 minutos. Contudo, a administração de CI-1041 ou CP-101,606 não alterou o padrão convulsivo em relação ao grupo SE+Sal.

Após 7 dias, o índice de mortalidade foi de 50% para o grupo SE+Sal e SE+CP, 46% para o grupo SE+CI e 11% para o grupo SE+Cet.

#### Peso Corporal



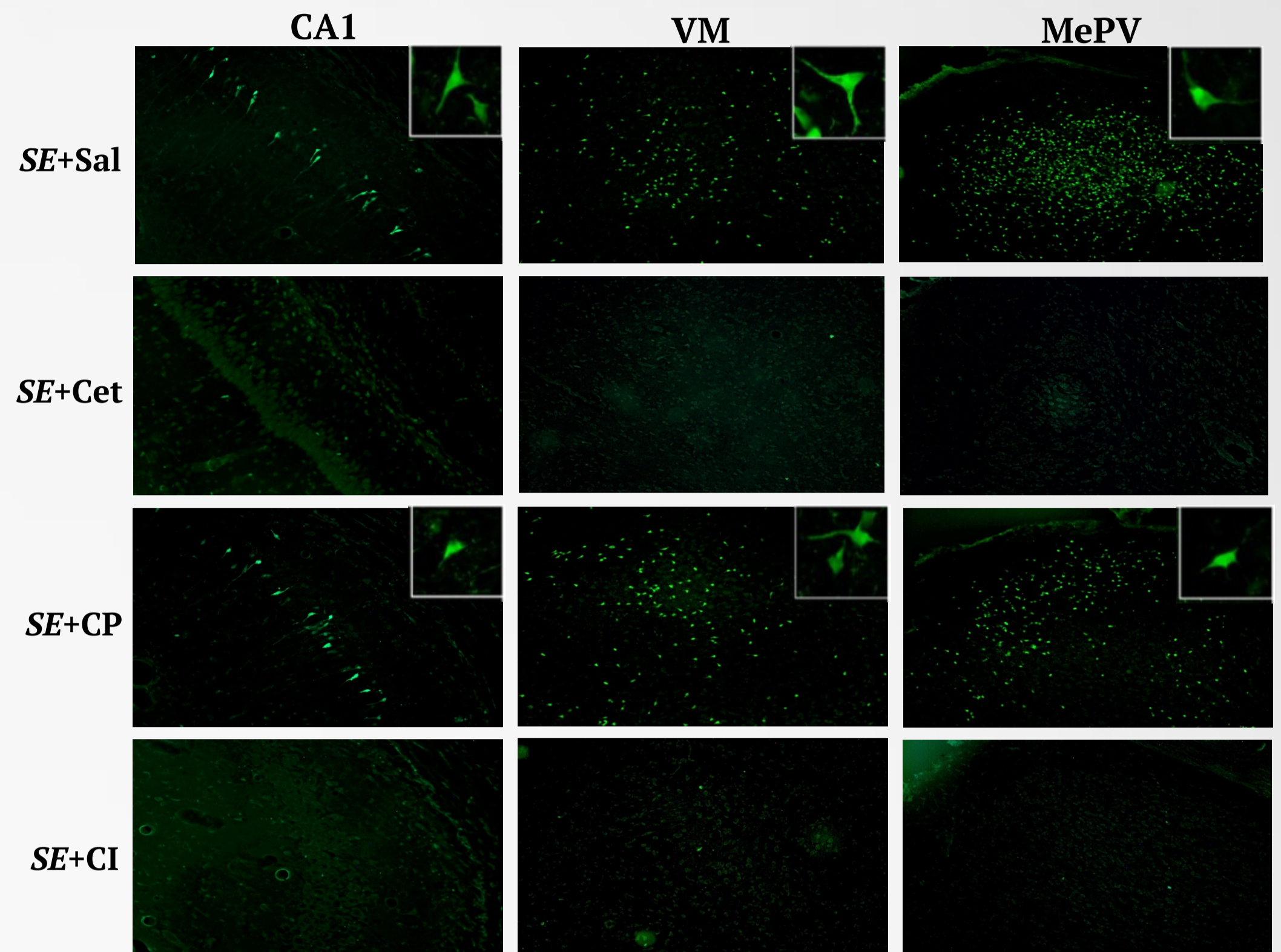
**Figura 1 - Ganho de Massa Corporal.** Alteração da massa corporal em relação a P15. O \* indica p<0.05 entre os grupos SE+Cet e SE+Sal. O # indica p<0.05 entre os grupos SE+CI e SE+Sal. Dados expressos em média ± SEM. One-way ANOVA seguido do Tukey's multiple comparisons test.

#### Avaliação Histológica

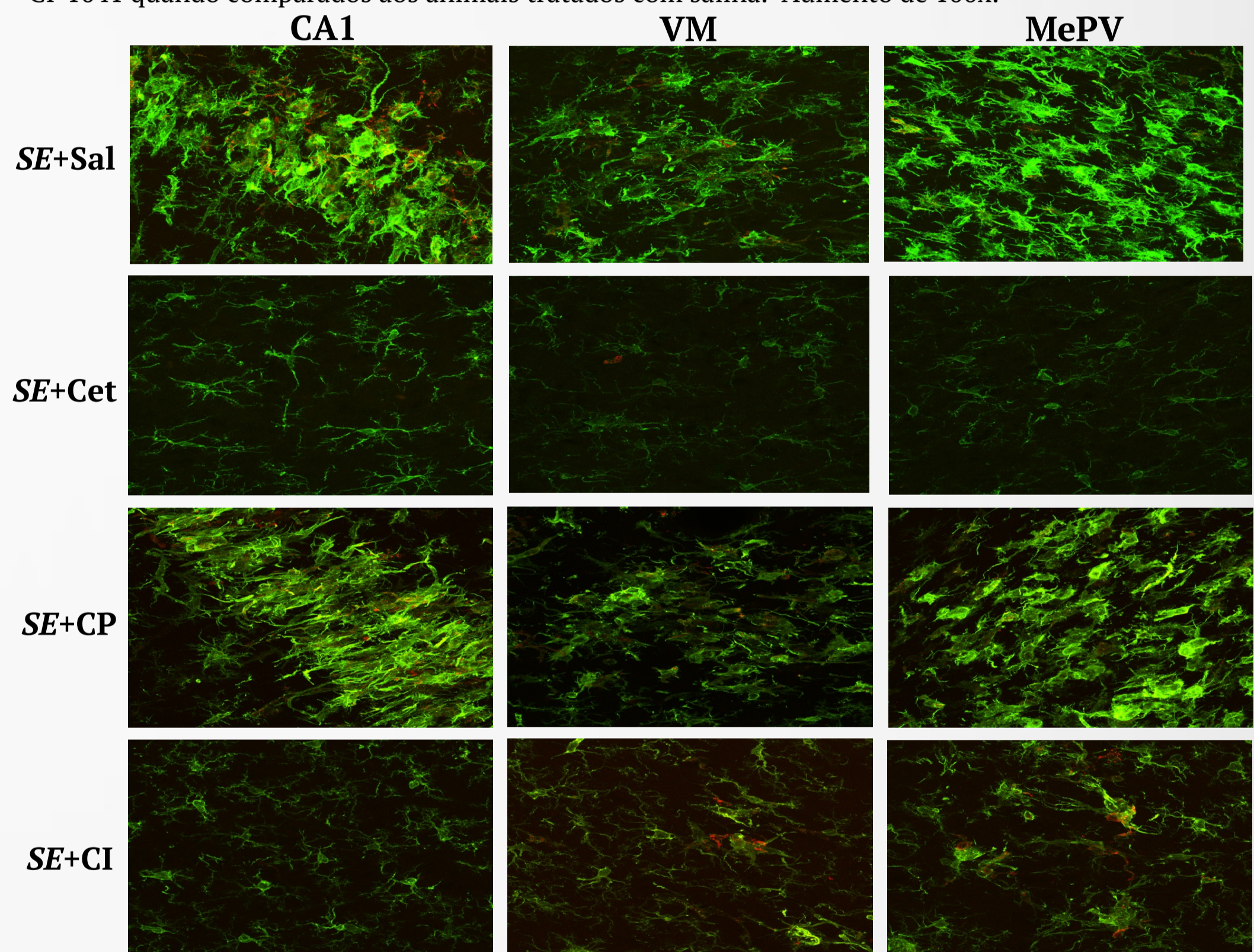
**Tabela 1 - Número de Neurônios Positivos para Fluoro-jade C**

Grupo	Estruturas Encefálicas		
	CA1	VM	MePV
SE+Sal	19.33±7.37	109.10±17.63	303.20±104.90
SE+Cet	NE*	NE*	NE*
SE+CP	10.50±7.03	76.10±13.46	319.90±98.70
SE+CI	NE*	2.58±2.58*	NE*

NE indica que nenhum neurônio foi encontrado. \* indica p<0.05 em comparação ao grupo SE+SAL. Média±S.E.M. Kruskal-Wallis test seguido de Dunn's multiple comparisons test.



**Figura 2 - Neurodegeneração induzida por SE.** Cortes coronais mostram um número reduzido de neurônios marcados com Fluoro-jade C nas regiões encefálicas de animais tratados com cetamina e CI-1041 quando comparados aos animais tratados com salina. Aumento de 100x.



**Figura 3 - Recrutamento e ativação microglial induzido por SE.** Imunofluorescências para Iba1 (recrutamento - verde) e ED1 (ativação - vermelho). Sobreposição de marcação possui uma coloração verde-amarelado. Análise qualitativa dos cortes coronais mostram uma redução no recrutamento e ativação microglial nos grupos SE+Cet e SE+CI quando comparado ao grupo SE+Sal. O tratamento com CP não alterou o recrutamento e ativação microglial quando comparado ao grupo SE+Sal. Aumento de 630x.

### Conclusão

- Diferentemente da cetamina, a administração de CP ou CI não foi o suficiente para atenuar as crises convulsivas.
- O tratamento com Cet ou CI acelerou a recuperação dos animais submetidos ao SE, uma vez que os animais de ambos os grupos recuperam massa corporal mais rapidamente que os animais do grupo SE+Sal (Fig. 1).
- A administração de Cet ou CI preveniu a massiva neurodegeneração induzida pelo SE em todas as regiões analisadas (Tabela 1 e Fig. 2), indicando um envolvimento da subunidade GluN2B nesse processo.
- O tratamento com Cet ou CI diminuiu o recrutamento e ativação microglial em todas as regiões analisadas (Fig. 3), indicando um envolvimento da subunidade GluN2B nesse processo.
- Juntos, nossos resultados sugerem que o antagonismo de NMDAR contendo a subunidade GluN2B durante o SE não é eficiente em cessar as crises epiléticas, porém é eficiente em evitar o dano cerebral a curto prazo. Estes dados sugerem que a subunidade GluN2B é um potencial alvo para o desenvolvimento de terapias antiepiléticas complementares.

#### Referências

- [1] Spigolon, G., et al (2010), c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in excitotoxic cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 31: 1261-1272. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07158.x
- [2] Holopainen, IE (2008), Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization, *Neurochemistry international*, 52, 935-47.
- [3] Loss, CM (2012), Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats, *Brain research*, 1474, 110-7

Apoio:

