

O antagonismo de receptores NMDA contendo subunidade GluN2B reduz a morte neuronal e o recrutamento microglial induzidos pelo *status epilepticus* em ratos jovens

Natã Ezequiel Sehn da Rosa, Diogo Losch de Oliveira

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

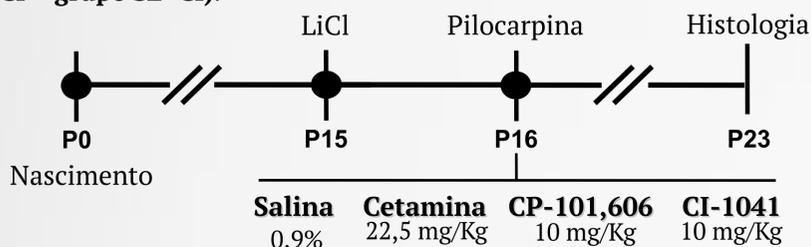
Introdução

O *status epilepticus* (SE) é definido como uma ou mais crises epilépticas sem recuperação da consciência com duração de 30 minutos ou mais.^[1] 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 glutamatérgicos do tipo NMDA (NMDAR)^[2], 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.)^[3]. 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, foram realizadas avaliações histológicas nas regiões CA1 e giro denteado do hipocampo (GD) e no núcleo medial póstero-ventral da amígdala (MePV). Foram realizadas as técnicas:

- Fluoro-Jade C: avalia neurodegeneração.
- 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^[3]. 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

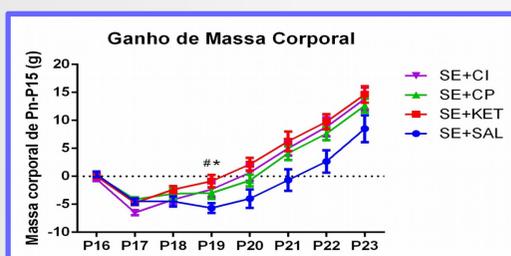


Figura 1 - Avaliação do ganho de massa corporal. O * indica p<0,05 entre os grupos SE+Cet e SE+Sal no dia P19. O # indica p<0,05 entre os grupos SE+CI e SE+Sal no dia P19. Dados expressos em média ± SEM. One-way ANOVA seguido do Tukey's multiple comparisons test.

Avaliação Histológica

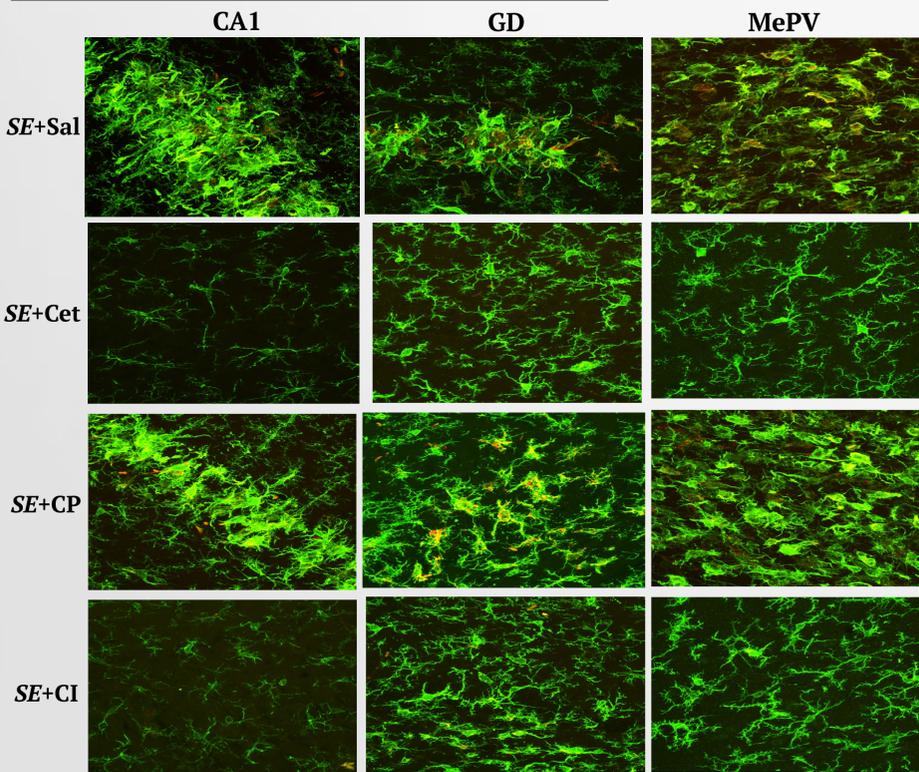


Figura 2 - Imagens representativas do recrutamento e ativação microglial induzidos por SE. Imunofluorescências para Iba1 (recrutamento - verde) e ED1 (ativação - vermelho). Sobreposição de marcação possui uma coloração verde-amarelado. Aumento de 630x.

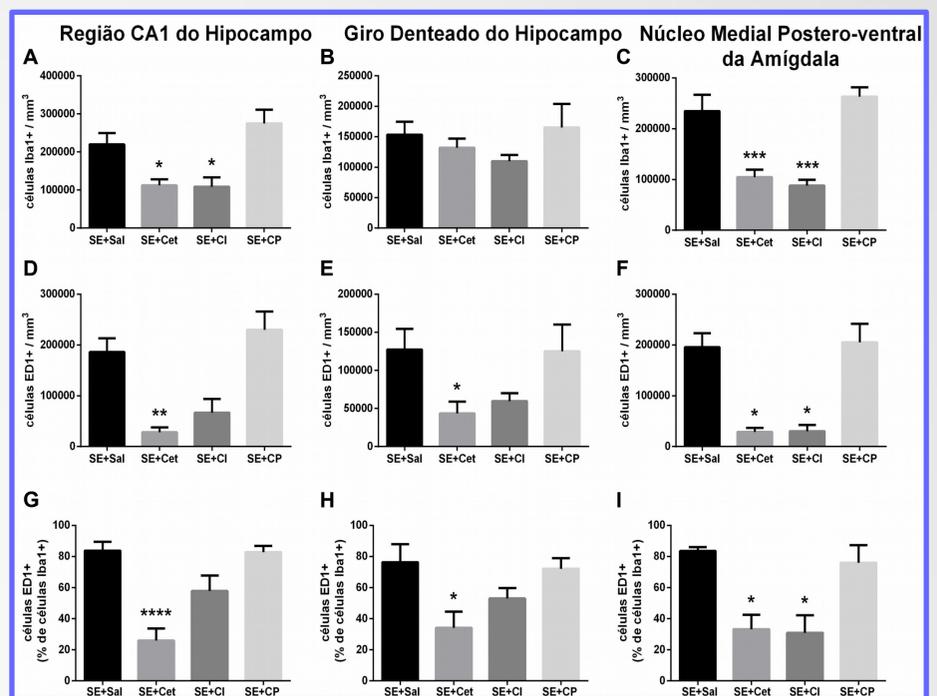


Figura 3. Avaliação quantitativa do recrutamento e da ativação microglial induzidos por SE. A - C. Avaliação do número de células Iba1+/mm³ de tecido. D - F. Avaliação do número de células ED1+/mm³ de tecido. G - I. Avaliação da porcentagem de células Iba1+ que possuem marcação ED1+. O * indica p<0,05 em relação ao grupo SE+Sal. O ** indica p<0,01 em relação ao grupo SE+Sal. O *** indica p<0,001 em relação ao grupo SE+Sal. O **** indica p<0,0001 em relação ao grupo SE+Sal. Dados expressos como média ± S.E.M. Dados analisado com One-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparisons test ou com Kruskal-Wallis test seguido de Dunn's multiple comparisons test.

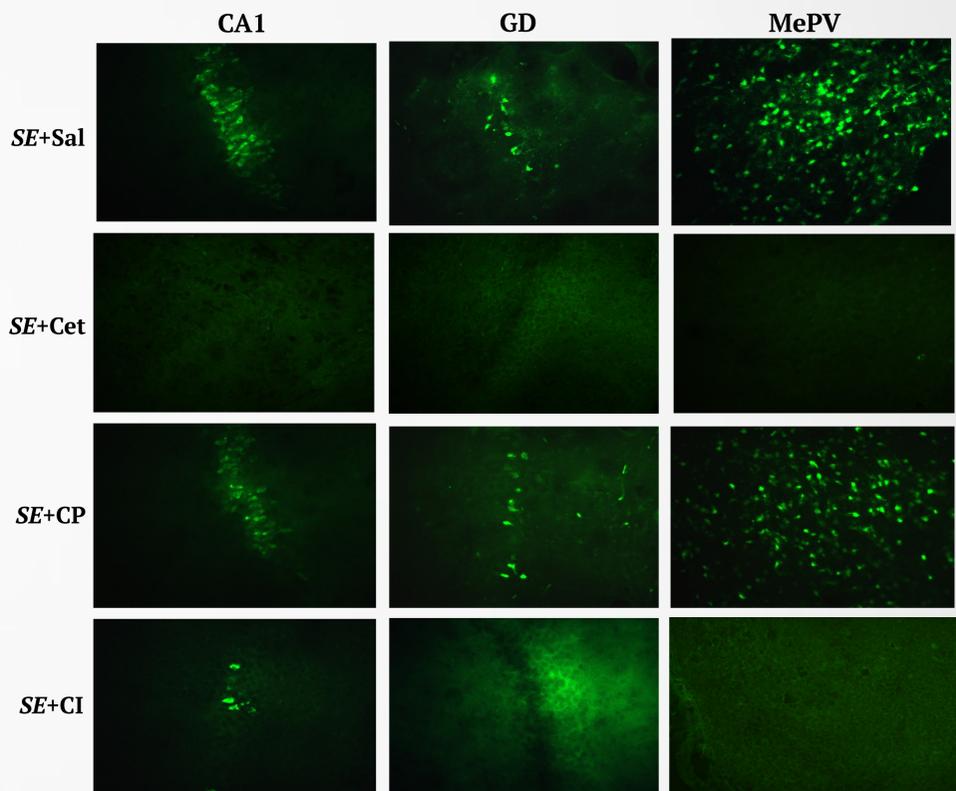


Figura 4 - Avaliação qualitativa da neurodegeneração induzida por SE. Cortes coronais mostram um número reduzido de neurônios marcados com Fluoro-jade C em todas as regiões encefálicas analisadas dos animais dos grupos SE+Cet e SE+CI, quando comparados ao grupo SE+Sal. O grupo SE+CP não apresentou alterações nas três regiões analisadas em relação ao grupo SE+Sal.

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).
- O tratamento com Cet reduziu o recrutamento microglial nas regiões CA1 e MePV e diminuiu a ativação microglial em todas as regiões analisadas (Fig. 2 e 3).
- O grupo SE+CI apresentou uma redução do recrutamento microglial nas regiões CA1 e MePV e uma diminuição da ativação microglial na região MePV, além de uma tendência à diminuição da ativação microglial nas regiões CA1 e GD, indicando o envolvimento da subunidade GluN2B nesses processos (Fig. 2 e Fig. 3).
- A administração de Cet ou CI foi capaz de atenuar a massiva neurodegeneração induzida pelo SE em todas as regiões analisadas (Fig. 4), 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 epilépticas, 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 antiepilépticas complementares.

Referências

- 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
- Holopainen, IE (2008), Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization, *Neurochemistry international*, 52, 935-47.
- 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:

