

## DÉFICIT COGNITIVO EM RATOS SUBMETIDOS AO *STATUS EPILEPTICUS* NEONATAL

### *COGNITIVE DEFICIT IN RATS FOLLOWING NEONATAL STATUS EPILEPTICUS*

Adelisandra Silva Santos Castelhana  
Maria Cristina Triguero Veloz Teixeira  
Roberta Monterazzo Cysneiros

Universidade Presbiteriana Mackenzie

#### Sobre os autores

##### **Adelisandra Silva Santos Castelhana**

Graduada em Biomedicina pela Universidade Metropolitana Unidas Mestre e Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie. Bolsista CAPES

##### **Maria Cristina Triguero Veloz Teixeira**

Psicóloga. Doutora em Filosofia da Saúde pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina. Professor Adjunto I do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

##### **Roberta Monterazzo Cysneiros**

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco, Mestre e Doutor em Farmacologia pela UNIFESP. Professor Adjunto I do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Apoio Financeiro: Mackenzie e CAPES

#### RESUMO

Status epilepticus (SE), uma condição aguda caracterizada por convulsões ou repetitivas ou prolongadas, ocorre mais frequentemente no período neonatal. Estudos clínicos e experimentais demonstram que crises neonatais podem ser prejudiciais para o cérebro imaturo com conseqüências deletérias de longo prazo. Recentemente demonstramos que o SE neonatal produz prejuízos na interação em ratos machos. Na condição humana, o retardo mental severo compromete a interação social. Este trabalho avaliou se o SE neonatal em ratos de ambos os gêneros produz prejuízos na aprendizagem. Ratos wistar de ambos os gêneros com nove dias pós-natal (PN9) receberam injeção intraperitoneal de pilocarpina (380 mg/kg) e os controles, salina. Em PN90 avaliou-se o desempenho dos animais em uma tarefa de condicionamento operante. Os resultados demonstraram o SE neonatal produziu prejuízo no desempenho de ratos de ambos os gêneros em uma tarefa de condicionamento operante. Estudos adicionais são necessários para elucidação dos mecanismos neurais e moleculares envolvidos.

Palavras-chave: status epilepticus, desenvolvimento, prejuízo cognitivo, gênero.

#### ABSTRACT

Status epilepticus (SE), an acute condition characterized by repetitive or prolonged seizures, occurs more frequently in the neonatal period. Clinical and experimental studies show that neonatal seizures can be harmful to the developing brain with long-term deleterious consequences. Recently we demonstrated that SE produces social impairment in male rats. In human condition, intellectual disability commits social interaction. Thus, this study evaluated whether the SE in neonatal rats of both genders produces learning impairments. Wistar rats of both genders in the ninth (P9) day of postnatal life (PN9) received intraperitoneal injection of pilocarpine (380 mg / kg) and controls received saline. At PN90 it was evaluated the animals performance in an operant conditioning task. The results demonstrated that a single episode of SE produces learning impairments in both genders in an operant conditioning task. Further studies are needed to elucidate the molecular and neural mechanisms involved.

Key-words: status epilepticus, animal model, learning impairments, gender.

## 1. INTRODUÇÃO

*Status epilepticus* (SE), uma condição aguda caracterizada por convulsões repetitivas ou prolongadas, é uma emergência clínica que afeta entre 120.000 a 200.000 pessoas por ano nos Estados Unidos (NEILL, LIU *et al.*, 2005; LOWENSTEIN, 2006). O SE ocorre mais frequentemente em neonatos e crianças que em adultos, com uma incidência de 1 a 3,5 por 1000 nascimentos (LAWRENCE E INDER, 2010) e em 40-50% dos casos crianças com idade inferior a dois anos (SHINNAR, PELLOCK *et al.*, 1997). Neonatos e crianças apresentam alto risco para convulsões comparativamente aos adultos. Neonatos apresentam risco elevado para exposição a insultos que podem resultar em crises convulsivas, a saber, traumatismo do nascimento, insulto hipóxico-isquêmico, infecções peri-natais, hemorragia intracraniana e distúrbios metabólicos. Além do maior risco de exposição aos insultos cerebrais, o cérebro imaturo é mais susceptível para convulsões que o cérebro maduro (BEN-ARI; HOLMES, 2006). Embora muitas convulsões em crianças sejam benignas e não resultem em conseqüências em longo prazo, estudos em animais e em humanos têm mostrado evidências sugerindo que crises convulsivas prolongadas durante o desenvolvimento cerebral podem resultar em seqüelas permanentes. No entanto, existem controvérsias se as convulsões *per se* contribuem para o prognóstico ruim ou se as crises são apenas sintomas de um dano cerebral preexistente (LAWRENCE E INDER, 2010). Os modelos animais são úteis uma vez que as variáveis podem ser controladas, têm replicando as evidências observadas em humanos como também permitem investigar os mecanismos moleculares subjacentes. Alguns estudos demonstram que ratos imaturos que experimentaram um único episódio de SE não apresentam alterações comportamentais, perda celular ou reorganização sináptica (STAFSTROM, THOMPSON *et al.*, 1992; HOLMES, GAIRSA *et*

*al.*, 1998; HAAS, SPERBER *et al.*, 2001). Em contrapartida, estudos mais recentes demonstram que um único episódio de SE neonatal traz prejuízos na memória dependente da integridade do hipocampo e na plasticidade sináptica por meio de alterações na transmissão sináptica inibitória (LYNCH, SAYIN *et al.*, 2000) e nas sinapses glutamatérgicas (CORNEJO, MESCHES *et al.*, 2007). Adicionalmente, demonstrou-se que o SE neonatal modifica as estruturas cerebrais envolvidas com o comportamento social: altera a circuitaria GABAérgica intracortical (DA SILVA, REGONDI *et al.*, 2005), aumenta a apoptose no tálamo (SANTOS, MARQUES *et al.*, 2000) e reduz os níveis de dopamina no córtex pré-frontal (LIN, HUANG *et al.*, 2009). Neste sentido, CASTELHANO e colaboradores, (2010, *in press*) avaliou o comportamento de brincar em ratos jovens de ambos os gêneros submetidos ao SE no nono dia pós-natal, utilizando o paradigma de intruso-residente. O SE neonatal produziu prejuízo social predominantemente nos machos, redução da atividade locomotora em ambos os gêneros e aumento do self-grooming nas fêmeas. Redução da atividade locomotora parece não ter contribuído para o prejuízo na interação social, desde que afetou ambos os gêneros e em contrapartida, o prejuízo na interação social foi observado somente nos machos. Uma vez que tem sido postulado que deficiência mental pode interferir no comportamento social, este trabalho avaliou se o SE neonatal em ratos de ambos os gêneros produz prejuízos na aprendizagem.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

## 2.1 ANIMAIS

Ratos wistar de ambos os gêneros receberam injeção intraperitoneal de pilocarpina (380 mg/kg) no nono dia pós-natal (PN9) e os controles receberam salina (0,1 mL/10 g). Após 4 horas, os animais retornaram para suas mães. Em P21 os animais foram sexados e agrupados de acordo com o gênero/colônia.

## 2.2 CAIXA DE CONDICIONAMENTO OPERANTE

Em PN 90 os animais foram privados de água por 38 horas. O protocolo experimental foi dividido em três etapas seqüenciais: registro do nível operante, modelagem e reforço contínuo. O nível operante, com duração de 15 minutos, teve como objetivo verificar o comportamento do animal antes de qualquer intervenção experimental. Imediatamente após, deu-se início a modelagem que teve o intuito de fazer com que o animal associasse o ruído do bebedouro à apresentação da água por meio do reforço. A modelagem foi encerrada após o rato pressionar a barra sete vezes sem interrupção e sem reforço. Após a modelagem foi dado início ao reforço contínuo da resposta de pressão à barra (CRF), cujo objetivo foi fortalecer a resposta de pressão à barra, e mantê-la em alta

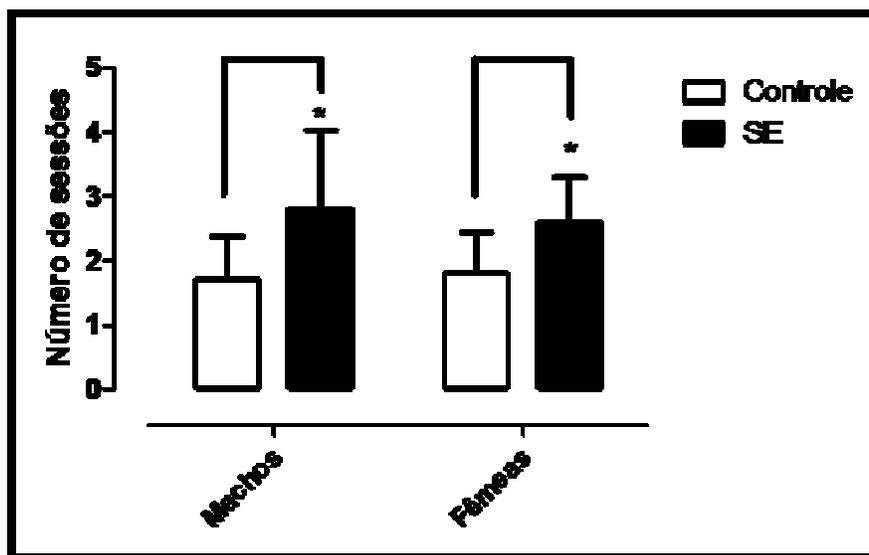
freqüência no repertório do comportamento animal, sem a intervenção do experimentador. Assim, a cada pressão à barra, o comportamento foi reforçado pela liberação automática da água. Assim, avaliou-se o número de sessões, com duração de 15 minutos, para que o rato aprendesse o comportamento desejado.

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni e considerados significantes para um valor de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

Como ilustrado na Figura 1, animais de ambos os gêneros expostos ao SE neonatal necessitaram de maior número de sessões para aquisição do comportamento de pressão à barra comparativamente aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias indicou efeito significativo da condição experimental ( $F_{[1,36]} = 12,64$   $p = 0,0011$ ), sem diferença entre os gêneros ( $F_{[1,36]} = 0,04$ ,  $p = 0,085$ ). Os resultados mostraram que o SE neonatal produziu déficit de aprendizagem em ambos os gêneros.



**Figura 1.** Número de sessões para aquisição do comportamento operante. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. SE neonatal produziu déficit de aprendizagem em ambos os gêneros. \*  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O cérebro imaturo é altamente excitável e susceptível para crises epiléticas (BEN-ARI; HOLMES, 2006) em um período que corresponde ao crescimento de axônios e dendritos, formação das sinapses e maturação das redes corticais (SWANN, 2004). Apesar de o cérebro imaturo ser mais susceptível para as crises epiléticas que o cérebro maduro, tem-se assumido que este é menos vulnerável aos danos estruturais induzidos pelo *status epilepticus*. Alguns estudos demonstram que ratos imaturos que experimentaram um único episódio de SE não apresentam alterações comportamentais, perda celular ou reorganização sináptica (STAFSTROM, THOMPSON *et al.*, 1992; HOLMES, GAIRSA *et al.*, 1998; HAAS, SPERBER *et al.*, 2001). Em contrapartida, estudos mais recentes demonstram que um único episódio de SE neonatal traz prejuízos na memória

dependente da integridade do hipocampo e na plasticidade sináptica por meio de alterações na transmissão sináptica inibitória (LYNCH, SAYIN *et al.*, 2000) e nas sinapses glutamatérgicas (CORNEJO, MESCHES *et al.*, 2007). Além disso, estudos em animais também demonstraram que o SE neonatal modifica estruturas cerebrais envolvidas com o comportamento social (DA SILVA, REGONDI *et al.*, 2005) e CASTELHANO *et al.*, (2010, *in press*) observaram prejuízos na interação social precoce de forma gênero dependente. Considerando que o prejuízo da interação social pode sofrer influência do déficit cognitivo houve o interesse em se avaliar o desempenho dos animais de ambos os gêneros submetidos ao SE neonatal em uma tarefa de condicionamento operante.

Os resultados revelaram que animais de ambos os gêneros submetidos ao SE, apresentaram déficits cognitivos. Nossos resultados são corroborados por inúmeros trabalhos que

mostraram efeitos similares (LYNCH, SAYIN *ET AL.*, 2000; SAYIN, SUTULA *ET AL.*, 2004; SWANN, 2004).

Apesar de o cérebro imaturo ser mais excitável que o cérebro adulto, o cérebro imaturo é mais resistente à morte celular induzida pelo SE, o que leva a interpretação equivocada que as crises não são prejudiciais ao cérebro em desenvolvimento (LAWRENCE E INDER, 2010). Assim, é improvável que a morte neuronal das células hipocâmpais seja a explicação para os déficits cognitivos observados no cérebro imaturo. Alternativamente, estudos eletrofisiológicos e morfológicos sugerem que o aumento da excitabilidade neuronal produz uma redução compensatória na transmissão sináptica glutamatérgica; poucas sinapses são formadas em decorrência de menor número de espinhos dendríticos e ou de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (SWANN, 2004).

Em consonância com a literatura, nossos resultados sugerem que crises prolongadas no cérebro imaturo, apesar de produzir um grau mínimo de lesão neuronal mensurável apresentam morbidade neurocognitiva de longo prazo como consequência das crises *per se*. De acordo com a hipótese inicial, aventamos a possibilidade que o déficit cognitivo de animais expostos ao SE neonatal contribuisse para o prejuízo da interação social precoce, conforme observado por Castelhana *et al.*, (2010, *in press*). Contudo, CASTELHANO *et al.*, (2010, *in press*) observou prejuízo na interação social somente nos ratos machos, no entanto, neste trabalho observamos déficit cognitivo em ambos os gêneros, sugerindo que os prejuízos na interação social e na cognição são aparentemente independentes e que não necessariamente o prejuízo em tarefas de aprendizagem irá afetar o desempenho da interação social.

Para compreender como e por que o SE afeta o comportamento de brincar somente nos machos, contudo produz déficit cognitivo em ambos os gêneros, devemos inicialmente assumir que o comportamento de brincar, além de ser

complexamente regulado é sexualmente dimórfico (PELLIS, 2002). Os hormônios esteroidais são os principais candidatos na regulação dos mecanismos neurais do comportamento social de brincar (OLIVEIRA, 2009). De acordo com hipótese da aromatase, o estradiol é sintetizado nos neurônios, especialmente no hipotálamo, uma região cerebral sujeita a diferenciação sexual a partir da testosterona fornecida pelos testículos durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Por outro lado, as gônadas femininas permanecem quiescentes e consequentemente o cérebro é exposto a baixos níveis de hormônios, resultando no comportamento típico das fêmeas (AMATEAU, ALT *et al.*, 2004). Contudo, estradiol também pode ser sintetizado *de novo* a partir do colesterol sob ação da aromatase no hipocampo e possivelmente no córtex. Neste caso, o estradiol é denominado de neuroesteróide (MCCARTHY, 2009).

A atividade da aromatase é elevada no cérebro imaturo, particularmente nas regiões relevantes para diferenciação sexual, como hipotálamo, e os machos apresentam maiores níveis de estradiol nestas regiões que as fêmeas, porém não no hipocampo no qual a atividade da aromatase é semelhante entre os gêneros (MCCARTHY, 2009). Nos estágios precoces do desenvolvimento o ácido gama-aminobutírico (GABA) é a principal fonte de excitação resultante no influxo de cálcio (BEN-ARI, 2002). Curiosamente, Nunez e Mccarthy, (2003) relataram que o estradiol exacerba a excitotoxicidade e a morte celular induzida pelo GABA. Neste contexto, o conjunto de evidências permite especular que as estruturas cerebrais que apresentam maiores níveis de estradiol são mais susceptíveis aos efeitos deletérios do SE neonatal. Estas evidências justificam o SE neonatal produzir prejuízos em tarefas de aprendizagem igualmente entre os gêneros, mas somente prejuízos na interação social em ratos machos. Estes resultados requerem pesquisas adicionais para uma melhor elucidação dos mecanismos neurais e moleculares envolvidos

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que um único episódio de SE neonatal produziu prejuízo no desempenho de ratos de ambos os gêneros em uma tarefa de condicionamento operante. Estes resultados requerem pesquisas adicionais para uma melhor elucidação dos mecanismos neurais e moleculares envolvidos.

## 7- REFERÊNCIAS

- AMATEAU, S. K. *et al.* Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* [S.I.], v. 145, n. 6, p. 2906-2917, 2004.
- BEN-ARI, Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 728-739, Sep 2002.
- BEN-ARI, Y.; HOLMES, G. L. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurology* [S.I.], v. 5, n. 12, p. 1055-1063, Dec 2006.
- CASTELHANO, A.S.S. *et al.* Social play impairment following status epilepticus during early development. *J Neural Transm.* 2010 Aug 15. [in press]
- CORNEJO, B. J. *et al.* Single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. *Annals of Neurology* [S.I.], v. 61, n. 5, p. 411-426, May 2007.
- DA SILVA, A. V. *et al.* Disruption of cortical development as a consequence of repetitive pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia* [S.I.], v. 46, p. 22-30, 2005.
- HAAS, K. Z. *et al.* Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 615-625, 2001.
- HOLMES, G. L. *et al.* Consequences of neonatal seizures in the rat: Morphological and behavioral effects. *Annals of Neurology* [S.I.], v. 44, n. 6, p. 845-857, Dec 1998.
- LIN, T. C. *et al.* Neonatal status epilepticus alters prefrontal-striatal circuitry and enhances methamphetamine-induced behavioral sensitization in adolescence. *Epilepsy & Behavior* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 316-323, Feb 2009.
- LAWRENCE R, INDER T. Neonatal Status Epilepticus. *Semin Pediatr Neurol.* 2010 Sep;17(3):163-168.
- LOWENSTEIN, D. H. The management of refractory status epilepticus: An update. *Epilepsia* [S.I.], v. 47, p. 35-40, 2006.
- LYNCH, M. *et al.* Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *European Journal of Neuroscience* [S.I.], v. 12, n. 7, p. 2252-2264, 2000.
- MCCARTHY, M. M. The Two Faces of Estradiol: Effects on the Developing Brain. *Neuroscientist* [S.I.], v. 15, n. 6, p. 599-610, Dec 2009.
- NEILL, J. C. *et al.* Pilocarpine seizures cause age-dependent impairment in auditory location discrimination. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* [S.I.], v. 84, n. 3, p. 357-370, Nov 2005.
- NUNEZ, J. L.; MCCARTHY, M. M. Estradiol exacerbates hippocampal damage in a model of preterm infant brain injury. *Endocrinology* [S.I.], v. 144, n. 6, p. 2350-2359, Jun 2003.
- OLIVEIRA, R. F. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integrative and Comparative Biology* [S.I.], v. 49, n. 4, p. 423-440, Oct 2009.
- PELLIS, S. M. Sex differences in play fighting revisited: Traditional and nontraditional mechanisms of sexual differentiation in rats.

*Archives of Sexual Behavior* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 17-26, Feb 2002.

SANTOS, N. F. *et al.* Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: A long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia* [S.I.], v. 41, p. S57-S63, 2000.

SAYIN, U. *et al.* Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. *Epilepsia* [S.I.], v. 45, n. 12, p. 1539-1548, Dec 2004.

SHINNAR, S. *et al.* In whom does status epilepticus occur: Age-related differences in children. *Epilepsia* [S.I.], v. 38, n. 8, p. 907-914, Aug 1997.

STAFSTROM, C. E. *et al.* Kainic acid seizures in the developing brain - status epilepticus and spontaneous recurrent seizures. *Developmental Brain Research* [S.I.], v. 65, n. 2, p. 227-236, Feb 1992.

SWANN, J. W. The effects of seizures on the connectivity and circuitry of the developing brain. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 96-100, 2004.