

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

Kamila Cagliari Zenki

**MODULAÇÃO DO PADRÃO CONVULSIVO E DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS E
COMPORTAMENTAIS EM CRISES EPILÉPTICAS ATRAVÉS DO
REPOSICIONAMENTO COM MENTANTINA**

Porto Alegre

2019

Kamila Cagliari Zenki

**MODULAÇÃO DO PADRÃO CONVULSIVO E DAS ALTERAÇÕES
CEREBRAIS E COMPORTAMENTAIS EM CRISES EPILÉPTICAS ATRAVÉS
DO REPOSICIONAMENTO COM MENTANTINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira
Co-orientadora: Prof. Dra. Cristiani Banderó Walker

Porto Alegre

2019

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.” **Isaac Newton**

“ – Você pode me ajudar?”

– Sim, pois não.

– Para onde vai essa estrada?”

– Para onde você quer ir?”

– Eu não sei, estou perdida.

– Para quem não sabe para onde vai, qualquer caminho serve.”

Lewis Carroll – Alice no país das maravilhas

AGRADECIMENTOS

A família é um dos pilares do gosto pelo saber... se não fosse por um lar que estimulasse meus estudos, essa tese obviamente seria impossível. Aos meus pais, que não mediram esforços para me oferecer uma educação de qualidade e abriram mão de muita coisa para que eu chegasse até aqui. O ensinamento dos valores morais me transformou em uma apaixonada pela Universidade. Nela pude ter o privilégio de permanecer todos esses anos, graças ao empenho de vocês para a realização deste sonho. Obrigada, pai e mãe, por me ajudarem a tornar isso possível. Além disso, de vocês eu ganhei um presente que foi essencial para o dia de hoje. À Mana por ser minha fiel escudeira e minha cúmplice. Apesar de ser uma chata de galochas, é minha amiga fiel e absoluta. Muito obrigada por estar comigo e aprender a aceitar a nuance mais tola e estressada de mim durante a construção desse trabalho. Mana, obrigada por existir e ser a minha companheira na saúde, na gerência das minhas infecções (hahahaha) e nas andanças da vida.

Ao meu melhor amigo, melhor colega e insubstituível parceiro Eduardo. Essa tese foi muito pesada sem ti. Por muitos momentos achei que não poderia suportar... afinal a nossa história foi o que de fato gerou essa tese. Esse trabalho jamais existiria sem ti e ter que viver essa luta tão distante de ti foi uma grande dor. Com certeza, se estivesse aqui, muitas coisas seriam diferentes e o sabor dessa conquista seria ainda mais doce. Te dedico o melhor que pude fazer e espero que fiques orgulhoso. Tu foste o meu grande inspirador e quem fez florescer em mim uma cientista. Eu nem tenho como te agradecer por fazer eu descobrir minha grande paixão pela ciência e o verdadeiro amor.

Ao meu orientador Diogo, que sempre estimulou em mim um potencial que nem eu mesma acreditava em ter. Quero agradecer pela liberdade e por auxiliar no fortalecimento do pensamento criativo, pelo respeito e sensibilidade nas questões humanas e pessoais. Por ser um amigo antes de orientador, sempre preocupado em oferecer condições dignas de trabalho e convivência apesar das situações difíceis. Por estimular que eu desbravasse novos horizontes dentro da minha carreira, e fazer com que a profissão que escolhi fosse cada vez mais almejada. Obrigada por todo o apoio e compreensão, pela paciência e flexibilidade. Obrigada por me fazer amar a arte de ensinar. A todos os colegas do Lab 24, antigos e novatos. Aos que me ensinaram técnicas, auxiliaram meus experimentos, aturaram a minha cara e ofereceram sua amizade. Obrigada pelos anos de convivência. Su, Thai e Gi, as mantenedoras na reta final. Valeu!

Aos meus amigos de fé, por terem se tornado uma família. Cris, Ane e Raquel, Charles e Jéssica, vocês estiveram comigo para dar base e apoio emocional nesta tese. Tornaram essa jornada menos árdua e se transformaram em pessoas ainda mais queridas. Aceitaram as minhas chatices, os meus choros, e toda a minha loucura. Agradeço especialmente ao Jorginho, que chegou com as gurias de mansinho para derreter meu coração. O dia em que nos conhecemos foi um divisor de águas na minha vida, e definitivamente salvou a minha tese, por isso não tenho palavras que bastem para te agradecer. Eu pude renascer e reviver quando o fardo estava pesado demais. Obrigada pela leveza, pelo bom humor e pela parceria que aliviaram as frustrações e deram ao sonho uma nova chance. Sem vocês este dia não teria chegado.

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 CNPQ, CAPES e FAPERGS.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
1. Epilepsias	2
1.1. Sistema glutamatérgico, neurotoxicidade e crises epilépticas	5
1.2. Abordagens farmacológicas para o tratamento das epilepsias	7
2. Reposicionamento de fármacos	9
2.1. Antagonismo de receptores NMDA como estratégia terapêutica para tratamento de crises epilépticas e reposicionamento de fármacos	12
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.1.1. Objetivos específicos do capítulo II.....	16
3.1.2. Objetivos específicos do capítulo II.....	16
PARTE II – ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	18
4. CAPÍTULO I	19
5. CAPÍTULO II.....	28
PARTE III – DISCUSSÃO GERAL.....	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	72
8. ANEXO I.....	73
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

A crise epiléptica prolongada é acompanhada por neurodegeneração, alterações nos biomarcadores relacionados ao dano celular e prejuízos comportamentais, e os antiepilépticos clássicos geralmente não são eficazes em proteger contra estas consequências. O reposicionamento de fármacos, com foco em um medicamento com ação multialvo, é uma solução viável para lidar com a epilepsia refratária e pode fornecer uma alternativa para o gerenciamento das consequências indesejáveis das crises. Antagonistas do receptor de N-metil-D-aspartato exibem ação anticonvulsivante e atuam como neuroprotetores. No entanto, estes compostos demonstraram muitos efeitos adversos inaceitáveis. Apesar disso, a memantina (MN), um antagonista do NMDAR de baixa afinidade, é clinicamente bem tolerado e não produz efeitos colaterais consideráveis. Portanto, o objetivo da presente tese foi investigar o efeito protetor da MN contra a degeneração neuronal, padrão convulsivo, marcadores neuroquímicos e alterações comportamentais a longo prazo, induzidos por modelos químicos de crises prolongadas. Ratos Wistar filhotes receberam MN (20 mg / kg i.p.) em diferentes regimes de tratamento antes e após a indução da crise no modelo de LiCl-pilocarpina. A neurodegeneração foi quantificada por fluoro jade C 24 horas após a crise. Os peixes-zebra foram pré-tratados com veículo ou MN (20 ou 50 mg / kg; i.p.) 1 h ou 2 h antes da imersão em solução de PTZ a 10 mM. As análises comportamentais e neuroquímicas foram realizadas 24 horas após a crise. Em CA1, a neurodegeneração diminuiu significativamente quando os ratos jovens receberam MN nos tempos de 0h e 0,25 h. Além disso, o pós-tratamento foi capaz de proteger contra a neurodegeneração na amígdala. O pré-tratamento com MN mostrou uma redução na morte celular no tálamo nos roedores. Já em peixe-zebra, a administração de MN reduziu a expressão relativa do gene *grin2A*. As crises induzidas com PTZ aumentam a carbonilação de proteínas e a atividade da SOD, e o tratamento com MN impediu essa alteração no estado redox. O peixe-zebra submetido às crises com PTZ apresentou aumento no tempo gasto na zona branca do aparato claro / escuro e a MN preveniu essa anormalidade comportamental. Nossos resultados demonstraram o efeito neuroprotetor da MN na morte neuronal induzida pelas crises no início da vida em ratos. Este efeito foi dependente do tempo e da região cerebral estudada. De fato, a ação anticonvulsivante da MN previne as alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao PTZ em peixe-zebra, reforçando o seu uso *off-label* para tratar as consequências neurocomportamentais da epilepsia.

ABSTRACT

Prolonged epileptic seizure is accompanied by neurodegeneration, damage-related biomarkers alterations and impaired behavior, and the classical antiepileptic drugs are not effective in protect these consequences. Repurposing with focus in a multi-target drug is a viable solution to deal with refractory epilepsy and may provide an alternative for management of undesirable consequences of seizures. Typical N-methyl-D-aspartate receptor antagonists exhibit anticonvulsant action and are currently able to provide neuroprotection against neuronal death. However, these compounds have demonstrated many side effects. Despite this, memantine (MN), a low-affinity NMDA antagonist, is clinically well tolerate and does not induce considerable side effects. Therefore, the aim of the present thesis was to investigate the protectives effect of the MN against neuronal degeneration, seizures pattern, neurochemical seizure markers and long-term behavioral alterations induced by chemical models of prolonged seizures. Wistar pup rats received MN (20 mg/kg i.p.) at different treatment regimens before and after seizure induction in Li-pilocarpine model. Neurodegeneration was quantified by fluoro jade C staining. Zebrafish were pre-treated with vehicle or MN (20 or 50 mg/kg; i.p.) 1h or 2h before immersion into PTZ solution at 10 mM. Behavioral and neurochemical analyses was performed 24 h after seizure. In CA1 subfield neurodegeneration was significantly decreased when animals received MN at 0h and 0.25h post-treatment regimens. Additionally, post-treatment was able to protect against neurodegeneration in amygdala region. MN pre-treatment showed a reduction of cell death in thalamus. MN reduced the relative grin2A gene expression. PTZ-seizure induction increase protein carbonylation and SOD activity, and MN treatment prevented this state redox imbalance. PTZ-challenged zebrafish presented increases in time spent in white zone into light/dark apparatus and MN prevented this behavioural abnormality. Our results demonstrated the neuroprotective effect of MN on neuronal loss induced by seizure early in life. This effect was time- and region-dependent. Indeed, anticonvulsant action of MN ameliorates behavioral and neurochemical PTZ-related changes in zebrafish seizure model, reinforcing the off-label use to treat neurobehavioral consequences of epilepsy.

Lista de abreviaturas

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

GABA – ácido γ -aminobutírico

GD – giro denteado

iGluRs – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

ILAE – International League Against Epylepsy

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. Epilepsias

As epilepsias são uma condição neurológica que afeta 2 a 3 % da população mundial, definindo-se como um distúrbio crônico do sistema nervoso central (SNC) e caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas (Abramovici and Bagić, 2016; Engel and International League Against Epilepsy (ILAE), 2001; Fisher et al., 2014). Ela acomete pessoas de todas as faixas etárias, sendo mais prevalente em crianças e idosos (Abramovici and Bagić, 2016). Nos Estados Unidos são gastos anualmente cerca de 15,5 bilhões de dólares para o tratamento de pacientes epiléticos, e estima-se uma prevalência de 50 milhões de pacientes no mundo e 2,4 milhões de novos casos ao ano (Theodore et al., 2006). Os indivíduos com epilepsia apresentam inúmeros prejuízos neurobiológicos, 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 (Fisher, 2015a).

O tratamento das epilepsias é fundamentalmente realizado através de terapia medicamentosa. A escolha do medicamento é complexa, e sem dúvida, o tipo de crise ou síndrome epilética é crucial nessa decisão. Ciente dessa importância, a *International League Against Epilepsy* (ILAE), órgão internacional que congrega profissionais voltados para o desenvolvimento de conhecimento e tratamento da epilepsia, buscou nos últimos anos aperfeiçoar a sua caracterização clínica (Fisher et al., 2014; Fisher, 2015a). Uma crise epilética é o resultado de uma descarga elétrica excessiva, anormal e geralmente hipsincrônica de um grupo de neurônios, que podem estar localizados em qualquer região cerebral. As manifestações clínicas destas crises estão relacionadas com a região onde a descarga se inicia e da sua possível propagação para áreas cerebrais adjacentes. Suas causas podem ser passíveis de identificação, como nos casos de tumores, trauma crânio-encefálicos, disfunção metabólica, infecção e doença vascular. Entretanto, em muitos casos, as causas destas crises são de etiologia desconhecida e com dificuldades para a escolha do melhor regime terapêutico (Engel, 2011; Fisher et al., 2014; Trinka et al., 2015).

Apesar dos avanços dos exames complementares em todas as especialidades médicas, o diagnóstico das epilepsias é primariamente clínico. O histórico, os exames físicos e neurológicos conduzem ao diagnóstico, enquanto os exames complementares confirmam e auxiliam na definição dos diagnósticos etiológicos e sindrômicos. Assim, a

caracterização da crise epiléptica é crucial para definir diagnóstico, tratamento e prognóstico. Em vias gerais, no que se refere à localização das crises epiléticas, elas podem ser classificadas em dois grandes grupos: crises epiléticas focais, que se restringem a uma região específica do SNC a qual origina e mantém a crise epilética; e crises epiléticas generalizadas, nas quais ambos hemisférios cerebrais apresentam hiperatividade, acometendo o cérebro em sua totalidade (Berg and Millichap, 2013). As crises epiléticas do tipo tônico-clônicas são um exemplo do segundo grupo, caso em que o paciente alterna entre episódios de tonia e extensão muscular com contrações musculares involuntárias (Fisher et al., 2014; Panayiotopoulos, 2011). O *Status epilepticus* (*SE*) por sua vez é caracterizado por uma crise epilética generalizada de longa duração (Trinka et al., 2015) ou várias crises sucessivas sem que haja recuperação da consciência entre uma crise e outra. Indivíduos acometidos pelo *SE* durante a infância podem apresentar, na idade adulta, alterações no comportamento emocional, esclerose hipocampal, déficit cognitivo e outras complicações tais como comorbidades psiquiátricas, com altos índices de evolução para epilepsia do lobo temporal na vida adulta (Fisher, 2015b; Hingray et al., 2019; Stewart et al., 2019; Tellez-Zenteno et al., 2007).

Outra classificação ocorre mediante a presença (sintomática) ou ausência (criptogênica) de etiologia definida (Berg and Millichap, 2013; Engel, 2011). Os dados epidemiológicos apontam que 60% dos pacientes epiléticos possuem epilepsia criptogênica. Além disso, 30% dos indivíduos epiléticos são refratários aos tratamentos farmacológicos disponíveis (Xiao et al., 2015) e 75% vivem em países em desenvolvimento e não possuem acesso a tratamentos adequados (Nwani et al., 2013). Dessa forma, a busca por novos tratamentos mais acessíveis e capazes de solucionar a refratariedade e a falha terapêutica (Newton and Garcia, 2012) impulsiona estratégias inovadoras de pesquisa, tais como, a busca por novos modelos animais que mimetizem as consequências das crises, bem como a diversificação das abordagens para a escolha de novos potenciais candidatos à terapia.

As epilepsias humanas englobam uma infinidade de manifestações clínicas, comportamentais e elétricas, caracterizando-se como um distúrbio multifatorial. Dessa forma, estudar esta condição neurológica em animais não humanos possibilitou a criação de uma série igualmente ampla de modelos animais; isto é, espécies e protocolos de indução de crises agudas ou crônicas dos mais variados, a fim de sanar as limitações um

do outro (Grone and Baraban, 2015). Neste contexto, a utilização de modelos animais em epilepsia auxilia na compreensão dos mecanismos de epileptogênese e suas implicações em longo prazo, bem como na descoberta de novos medicamentos. Por exemplo, permitem avaliações morfológicas como: verificação da redução do volume hipocampal, amigdalár e do córtex perirrinal de ratos que foram induzidos ao SE aos 12 dias de vida (Nairismagi et al., 2006); presença massiva de morte neuronal no núcleo mediodorsal do tálamo em crises convulsivas prolongadas (Kubová et al., 2001); e a relação de muitas dessas alterações com prejuízos cognitivos na vida adulta (de Oliveira et al., 2008; Loss et al., 2012a; Mussulini et al., 2018). Além disso, as crises epilépticas podem ser estudadas em modelos genéticos e/ou modelos não genéticos, podendo-se fazer uso de mais de um modelo a depender da pergunta do estudo (Grone and Baraban, 2015; Todorova et al., 2000).

Os modelos não genéticos de crises epilépticas se baseiam na administração de compostos pró-convulsivos, os quais alteram o balanço entre os sistemas excitatórios e inibitórios do SNC (Leke and Schousboe, 2016; Zhou and Danbolt, 2014). A pilocarpina, um agonista colinérgico, quando 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). Este modelo foi aprimorado por Clifford e colaboradores (1987), os quais demonstraram que um pré-tratamento com cloreto de lítio (LiCl) potencializa a ação epileptogênica da pilocarpina, possibilitando uma redução na dose administrada, o que diminui consideravelmente os efeitos colinérgicos periféricos e conseqüentemente a mortalidade, sem alterar, no entanto, o padrão convulsivo. O composto pentilenotetrazol (PTZ) inibe os receptores ionotrópicos do tipo GABA_A, reduzindo a capacidade do sistema inibitório, resultando em hiperexcitabilidade que culmina na geração das crises epilépticas agudas ou prolongadas. O PTZ é o agente pró-convulsivo mais utilizado na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas terapias (Baraban et al., 2005). O modelo animal ideal deve apresentar os mecanismos causais da patologia, o perfil fenotípico da crise e a resposta anticonvulsiva frente a tratamentos clínicos já validados (Grone and Baraban, 2015). Assim, ambos agentes pró-convulsivantes possuem semelhanças cruciais para o estudo das epilepsias, porém mecanismos distintos para iniciação e propagação das crises,

bem como desfechos neuroquímicos e comportamentais de longo prazo diferentes um do outro.

1.1. Sistema glutamatérgico, neurotoxicidade e crises epiléticas

O glutamato é um aminoácido distribuído amplamente no cérebro de mamíferos e desempenha inúmeras funções essenciais em diversas regiões encefálicas, particularmente como um neurotransmissor excitatório e precursor do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico, o GABA (Sanacora et al., 2008). O sistema glutamatérgico é o principal mecanismo de neurotransmissão excitatório no cérebro de mamíferos e regula 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). Seu papel crucial na fisiologia cerebral faz com que distúrbios na homeostase glutamatérgica estejam envolvidos em diversas patologias do SNC, sendo responsáveis por alterações comportamentais, eventos de morte celular, dentre outros (Matsui et al., 2005; Nedergaard et al., 2002; Pál, 2018). Para que a neurotransmissão glutamatérgica ocorra, as vesículas sinápticas contendo glutamato liberam o seu conteúdo na fenda sináptica e o neurotransmissor liga-se aos receptores expressos na membrana neuronal: 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 dos receptores e por conseguinte seu efeito fisiológico ou tóxico (Yin and Niswender, 2014; Zhou and Danbolt, 2014).

Os iGluRs compreendem três tipos de receptores: kainato (KARs), amino-3-hidroxi-S-metil-isoxazol-4-propionato (AMPArs) e N-metil-D-aspartato (NMDARs). Diferentemente dos AMPARs e KARs que são permeáveis majoritariamente a Na^{+2} , os NMDARs são canais dependentes de voltagem altamente permeáveis a 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 central na plasticidade sináptica, com efeitos diretos na potenciação de longa duração e na depressão de longa duração. Em contrapartida, a hiperestimulação de NMDARs está diretamente relacionada a um evento patofisiológico denominado de excitotoxicidade neurodegenerativa (Mehta et al., 2013).

Há cerca de cinco décadas surgiu a primeira evidência de que o glutamato possui efeitos tóxicos para o SNC, podendo ser capaz de causar a morte de células da retina (Lucas and Newhouse, 1957). Posteriormente, John Olney (1969) propôs o termo excitotoxicidade e demonstrou que o excesso de glutamato desencadeia um fenômeno nas células neuronais dependente do influxo de íons Ca^{+2} (Choi, 1987) através de NMDARs (Choi et al., 1988). Atualmente, a modulação da neurotransmissão mediada pelos NMDARs tem importantes implicações na origem da lesão e na morte celular observadas em um amplo espectro de condições neurológicas diferentes, incluindo acidente vascular cerebral, hipóxia, isquemia, doença de Alzheimer, e epilepsias (Flores-Soto et al., 2012; Hardingham, 2009). Estas condições compartilham características patognomônicas, incluindo perda neuronal gradual e seletiva, principalmente devido à hiperatividade de NMDARs, com um aumento na concentração de Ca^{+2} citosólico e a geração de espécies reativas de oxigênio (Betzen et al., 2009; Di Maio et al., 2011; Flores-Soto et al., 2012). Os NMDARs, assim como demais iGluRs, são complexos heteromultiméricos, os quais são constituídos 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 constitutivas GluN1 e duas regulatórias subunidades GluN2 (Dingledine et al., 1999; Watkins and Jane, 2009). Menos comumente, os NMDARs podem conter subunidades GluN3. Desta forma, levando-se em consideração que a subunidade GluN1 é constitutiva e, portanto, presente em todos os NMDARs, existem diferentes combinações de subunidades ao longo das diferentes regiões cerebrais (Henson et al., 2010; Paoletti et al., 2013).

O glutamato desempenha um papel fundamental na iniciação e na propagação da atividade convulsiva. Sabe-se que a administração focal de glutamato em diferentes estruturas cerebrais, bem como a administração focal ou sistêmica de agonistas glutamatérgicos como NMDA, AMPA ou ácido cáinico causam convulsões e alterações eletroencefalográficas em animais, e atividade epileptiforme em preparações de células e fatias *in vitro* (Chapman, 1998; Hayashi, 1952). Além disso, os NMDARs demonstraram estar intimamente relacionados ao processo de epileptogênese. Os antagonistas competitivos e não competitivos dos NMDARs inibem crises convulsivas *in vivo* e atividade epileptiforme em modelos *in vitro* (Gilbert, 1988; Manjarrez et al., 2001). Existe

uma hipótese de que os NMDARs estejam envolvidos com o desenvolvimento de da refratariedade em crises convulsivas, e que o tratamento com antagonistas NMDA seria efetivo em pacientes multirresistentes (Fang and Wang, 2015). Ademais, em modelos de *kindling* utilizando eletrochoque, a eficácia da transmissão sináptica excitatória de longa duração está intimamente relacionada com a concentração de glutamato extracelular, com a ativação dos NMDARs e com a inibição de receptores do tipo GABA (Babb et al., 1998; Morimoto, 1989; Ying et al., 1999). Também já foi demonstrado que existem mudanças na expressão das subunidades de NMDARs e AMPARs em roedores e humanos epiléticos (Babb et al., 1998; Doi et al., 2001; Mathern et al., 1998; Mikuni et al., 1999). Postnikova e colaboradores (2017), demonstraram que a alteração na expressão das subunidades do NMDAR depois do SE reduz a magnitude da potenciação de longa duração em sinapses hipocâmpais, e isto poderia explicar algumas das alterações comportamentais relacionadas ao SE. Todos estes achados corroboram para elucidar os benefícios da modulação do sistema glutamatérgico no tratamento das crises refratárias e para o estudo dos mecanismos de epileptogênese.

1.2. Abordagens farmacológicas para o tratamento das epilepsias

O primeiro fármaco antiepilético a ser comercializado, o brometo de potássio, foi introduzido por um obstetra inglês chamado Charles Locock, em 1857, ao observar sua eficiência no controle das crises em 14 mulheres com epilepsia catamenial (Pearce, 2002). A partir de então, medicamentos antiepiléticos são a principal abordagem para o tratamento das epilepsias e apresentam eficácia terapêutica em cerca de dois terços dos pacientes. Assim, surgiram diversos outros medicamentos de primeira, segunda ou terceira geração, sendo classificados de acordo com a época em que os fármacos foram introduzidos no mercado e com as suas características moleculares e mecanismos de ação. Mais de 15 deles (de segunda geração) foram introduzidos durante os anos 90, ampliando as oportunidades de tratamento para cada paciente. Considerando que atualmente estão disponíveis cerca de 27 fármacos antiepiléticos licenciados, os resultados gerais obtidos até então não foram alterados substancialmente, e cerca de um terço dos pacientes continuam não respondendo à terapia medicamentosa. Assim, a cirurgia de epilepsia ainda continua sendo o tratamento mais eficaz para epilepsias refratárias (Perucca et al., 2018).

Neste cenário, os benzodiazepínicos, moduladores alostéricos positivos de receptores GABA_A, são a primeira linha de tratamento nos protocolos atuais de

intervenção. Entretanto, são menos efetivos em bloquear as crises do que os tratamentos de segunda linha. A fenitoína é classicamente considerada como tratamento de segunda linha, e atua como um estabilizador dos canais de sódio voltagem-dependentes. O fenobarbital por sua vez aumenta a inibição mediada por GABA e também antagoniza os AMPARs. Embora esses dois medicamentos sejam muito eficazes, eles estão relacionados a inúmeros efeitos adversos periféricos e centrais. Já o ácido valpróico aumenta a síntese de GABA, inibe a GABA transaminase, atua como estabilizador de canais de sódio voltagem-dependentes e como inibidor de canais de cálcio tipo T. Assim como os demais, apresenta numerosos efeitos adversos e elevadas taxas de interação medicamentosa, dificultando o seu uso em casos de polifarmácia, muito comum no tratamento de epilepsias. A lacosamida também atua nos canais de sódio voltagem-dependentes. O levetiracetam inibe a liberação de neurotransmissores atuando na fusão das vesículas e modula os receptores de glutamato, sendo o tratamento que apresenta menor efeitos adversos e menos interações medicamentosas. Ainda, existem alguns casos onde são adotados protocolos de infusão contínua, nos quais são utilizados midazolam, tiopental, pentobarbital ou propofol (Amengual-Gual et al., 2019). Além dessas abordagens clássicas, novas estratégias estão em pauta atualmente, como inibidores da glicoproteína-P, terapia gênica, esquemas de associação medicamentosa, uso de canabinóides e utilização de células tronco. Todos estes esforços se devem ao elevado nível de pacientes refratários a terapia medicamentosa, números estes que permaneceram inalterados ao longo dos anos, apesar das novas opções disponíveis no mercado (Mesraoua et al., 2019).

Todos este medicamento são aplicados na clínica com boas taxas de sucesso para controlar crises epiléticas, embora os mecanismos de ação se sobreponham, o que limita o espectro de eficácia (Glauser et al., 2016). Entretanto, a maior parte deles são ineficazes no controle dos desbalanços neuroquímicos que estão associados ao dano cerebral, sendo incapazes de proteger contra a morte neuronal, além de apresentarem uma infinidade de efeitos adversos sobre a cognição e o comportamento (Abdalla et al., 2014; Ahmed et al., 2011; Kalemenev et al., 2016; Trinka et al., 2015). Ademais, não possuem atividade antiepileptogênica, ou seja, são incapazes de bloquear as alterações cerebrais implicadas na gênese das crises convulsivas (Loscher and Brandt, 2010; Pitkänen et al., 2013). Por conseguinte, não são capazes de prevenir futuras condições psiquiátricas e demais comorbidades associadas às epilepsias (Holmes and Noebels, 2016). Além disso, alguns

dos medicamentos utilizados no tratamento das epilepsias demonstraram induzir uma frequência bastante alta de sintomas depressivos em ensaios clínicos, e também se relacionam com um aumento do risco de autoagressão ou comportamento suicida na prática clínica (Andersohn et al., 2010).

Efeitos anticonvulsivos e efeitos neuroprotetores não são sinônimos, embora algumas vezes, se uma crise convulsiva severa ou do tipo *SE* são prevenidos ou significativamente atenuados através de uma terapia antiepiléptica bem-sucedida, o dano neuronal pode não ocorrer (Velísek and Velísková, 2008). 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 das crises concomitantemente. Quando o comportamento convulsivo não foi diferente de um animal não tratado, a progesterona não foi efetiva para o bloqueio do dano neuronal. 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 (Velísek and Velísková, 2008). Assim, uma terapia anticonvulsivante sintomática que previna a morte neuronal, ou a combinação de terapias neuroprotetoras e anticonvulsivantes constituem a melhor abordagem farmacológica atual para o tratamento das epilepsias.

2. Reposicionamento de fármacos

Disponibilizar um novo medicamento no mercado é uma tarefa muito cara e demorada. As estimativas gerais mostram que os custos capitalizados dessa tarefa variam de aproximadamente 160 milhões a 1,8 bilhão de dólares. Dessas estimativas, os estágios iniciais de desenvolvimento representam cerca de 51% dos gastos. Além do elevado custo, o cronograma desse processo é de cerca de 15 anos, com uma taxa de sucesso máximo de apenas 11,5% (DiMasi, 2001; DiMasi et al., 2003; Morgan et al., 2011). Estes são alguns dos dados que justificam os declínios na produtividade da indústria farmacêutica nas áreas de pesquisa e desenvolvimento de fármacos ao longo dos anos (DiMasi, 2001). Assim, nos últimos anos a pesquisa farmacêutica para desenvolvimento de novos fármacos expandiu suas fronteiras na descoberta e nos estudos fisiológicos do alvo de interesse, aliando técnicas computacionais ao conhecimento molecular dos processos patológicos, o que trouxe inúmeras vantagens para novos candidatos a

fármacos. Entretanto, a descoberta e desenvolvimento de fármacos ainda é um processo complexo, demorado e caracterizado como um empreendimento de alto custo (Barnieh et al., 2014; DiMasi et al., 2003).

Neste contexto, as abordagens comumente utilizadas para o desenvolvimento de medicamentos focam na identificação de um novo alvo de tratamento ('de novo'), seguido da busca por um composto capaz de modular esse alvo e, por último, um estudo de validação. Entretanto, alvos adicionais para esses compostos geralmente não são investigados, e outras aplicações clínicas geralmente não são exploradas. No entanto, esses elementos extras representam uma oportunidade para a identificação sistemática de novas indicações para a terapêutica existente. De fato, alguns dos medicamentos com mais sucesso comercial são administrados para diferentes indicações do que aquela inicialmente prevista em seu desenvolvimento (uso *off-label*) (Dudley et al., 2011; Shameer et al., 2015). Assim, a prática de identificar indicações terapêuticas adicionais para compostos existentes, referida como 'reposicionamento', possui alguns benefícios importantes sobre os métodos tradicionais de desenvolvimento de medicamentos (Ashburn and Thor, 2004; Barratt and Frail, 2012). O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que envolve encontrar novas aplicações terapêuticas para fármacos já disponíveis no mercado. Quando comparada à busca por novos medicamentos (utilizando a estratégia 'de novo'), é uma abordagem vantajosa por apresentar maior probabilidade de sucesso e representar uma redução expressiva nos custos e na linha de tempo do desenvolvimento (Ashburn and Thor, 2004; Barratt and Frail, 2012). Esta estratégia de redescobrir o valor de 'moléculas velhas' cresceu nos últimos anos, possibilitando o uso *off-label* de centenas de compostos com eficácia e segurança, o que estimulou a criação de bancos de dados com os potenciais alvos e permitindo uma maior interação entre indústria e academia (Caban et al., 2017; Murteira et al., 2014).

De fato, as receitas obtidas por medicamentos reposicionados podem ser extremamente lucrativas. Por exemplo, as vendas de talidomida, reposicionada para o tratamento de mieloma múltiplo, alcançaram milhões de dólares e o sildenafil, reposicionado para disfunção erétil, obteve vendas anuais de 1,88 bilhão de dólares em 2003 (Ashburn and Thor, 2004; Barratt and Frail, 2012). Além disso, o processo de desenvolvimento de medicamentos para um medicamento reposicionado pode ser encurtado para cerca de 3-10 anos, principalmente porque várias etapas do *pipeline* de desenvolvimento podem ser eliminadas (Dudley et al., 2011; Shameer et al., 2015). Estas

incluem: seletividade para o alvo; estudos de farmacocinética; toxicologia; e efeitos indesejáveis. Estes são obstáculos potenciais que acarretam em divergências nos testes em espécies animais e humanos, os quais são facilmente superados para fármacos reposicionados (Parsons, 2019). Adicionalmente, o reposicionamento de fármacos nos permite racionalizar a pesquisa para uma terapia multialvo, porque possibilita a identificação de compostos que produzem um efeito terapêutico esperado e reconhecido através da observação fenotípica (Kodama et al., 1997). Uma droga multialvo apresenta diferentes farmacóforos em uma única molécula ou um farmacóforo comum para diferentes alvos, ampliando o espectro de aplicabilidade clínica e contornando algumas limitações da farmacoterapia clássica (Morphy et al., 2004).

O reposicionamento é particularmente relevante em áreas terapêuticas menos exploradas, como no tratamento de doenças do SNC, doenças pediátricas ou órfãs, dentre outras (Caban et al., 2017). Sabidamente, no arsenal terapêutico para o tratamento da Doença de Parkinson, existe um medicamento reposicionado denominado amantadina. A amantadina foi inicialmente desenvolvida para o tratamento da gripe e, somente mais tarde, direcionada ao tratamento da Doença de Parkinson por atuar como um antagonista dos receptores de glutamato e por aumentar os níveis de dopamina. No caso da Doença de Alzheimer por exemplo, verificou-se que os medicamentos contra o câncer podem ser reaproveitados em seu tratamento. A lógica por trás dessa ideia vem do fato de que o câncer e a neurodegeneração compartilham vias de sinalização, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, comprometimento do metabolismo celular e síntese de proteínas malformadas, além de evidências clínicas nas quais pacientes tratados com quimioterapia também apresentam um risco menor de desenvolver Alzheimer em sua velhice (Durães et al., 2018). Assim, a semelhança nos mecanismos patognomônicos é crucial para o desenvolvimento de um reposicionamento de sucesso. Neste aspecto, o ácido valpróico é um exemplo de medicamento antiepiléptico sugerido como um agente neuroprotetor para a doença de Alzheimer, apontando para similaridades entre o Alzheimer e epilepsia (Mark et al., 1995; Tariot et al., 2011). Este candidato ao reposicionamento mostrou redução na formação de placas amiloides, melhoria nos déficits de memória em camundongos transgênicos, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da fagocitose microglial (Qing et al., 2008; Smith et al., 2010; Tariot et al., 2011).

Especialmente no caso de fármacos antiepilépticos, a indústria farmacêutica vem diminuindo progressivamente seu interesse no desenvolvimento de novos compostos. Isto se deve ao fato de que os custos são infinitamente maiores quando analisados em separado (cerca de 335 milhões de dólares) e com uma razão de sucesso em torno de 5% (sem mencionar a parcela de pacientes refratários). Estes dados desencorajam e diminuem os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos antiepilépticos. Assim, das condições que afetam o SNC, o reposicionamento de fármacos para o tratamento das epilepsias é uma oportunidade comercial imediata. Selecionar medicamentos de outras áreas terapêuticas que possuam propriedades modificadoras de doença relevantes para as epilepsias, ou um novo mecanismo de ação que forneça substancial eficácia sinérgica contra epilepsia resistente a medicamentos (a fim de encontrar um fármaco que possa ser utilizado combinado com uma terapia existente), pode reduzir drasticamente o nível de investimento necessário para a descoberta e desenvolvimento (Löscher et al., 2013). Especificamente no caso do *SE*, no qual os medicamentos disponíveis têm uma taxa relativamente alta de falha, ampliaram-se as discussões sobre reposicionamento de fármacos, particularmente aplicando-os em polifarmacoterapia. As novas estratégias de tratamento visam direcionar a fisiopatologia do *SE*, a fim de reduzir a recorrência de crises epiléticas e seus impactos/consequências à longo prazo. Alguns dos exemplos de fármacos explorados são os moduladores dos receptores GABA_A sinápticos e extrasinápticos (como a alopregnanolona) e antagonistas de NMDARs (como a cetamina) (Amengual-Gual et al., 2019). Além disso, realizar o reposicionamento da molécula desejada em diferentes modelos de indução e em organismos de diferentes espécies pode providenciar maior chance de sucesso. Assim, selecionamos uma molécula com maior probabilidade de ser efetiva clinicamente.

2.1. Antagonismo de receptores NMDA como estratégia terapêutica para tratamento de crises epiléticas e reposicionamento de fármacos

Os antagonistas competitivos de NMDARs como AP-7, CGP 40116, APV, CPP, dentre outros, demonstraram possuir um amplo espectro de atividade anticonvulsivante em diversos modelos animais de crises generalizadas (PTZ, 4-AP, NMDA, eletrochoque, bicuculina e cocaína), e em modelos de *SE* (pilocarpina e estimulação elétrica hipocampal contínua) (Aldinio et al., 1983; Chapman et al., 1990; Croucher et al., 1982; Czuczwar et al., 1985b, 1985a; Czuczwar and Meldrum, 1982; Eblen et al., 1996; Fujikawa et al., 1994; Ghasemi and Schachter, 2011; Millan et al., 1986; Morales-Villagrán et al., 1996;

Turski et al., 1990; Yen et al., 2004). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que AP-7 e APV reduzem a atividade epileptiforme induzida por baixa concentração de Mg^{+2} , penicilina e picrotoxina em neurônios hipocampais (Ashton et al., 1988; Brady and Swann, 1986). Por outro lado, os antagonistas não competitivos de NMDARs como cetamina, MK-801, ifenprodil, entre outros, demonstraram efeitos anticonvulsivantes em modelos de crises tônico-clônicas generalizadas (induzidas por NMDA, cocaína, bicuculina, PTZ, 4-AP) (Geter-Douglass and Witkin, 1999; Ghasemi and Schachter, 2011; Parsons et al., 1995; Swinyard et al., 1986; Turski et al., 1990; Zaitsev et al., 2015). Em modelos químicos de *SE* (ácido caínico e pilocarpina), cetamina, MK-801 e ifenprodil possuem atividade anticonvulsivante e diminuem os danos cerebrais relacionados às crises (Clifford et al., 1990; Ding et al., 2007; Freitas et al., 2006; Fujikawa, 1995; Halonen et al., 1999; Hughes et al., 1993; Yen et al., 2004). Estudos em modelos animais demonstraram 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; Kubová et al., 2004; Sankar et al., 1998a), e que esta neurodegeneração está associada com a hiperestimulação de NMDARs (Holopainen, 2008), o que justifica o efeito neuroprotetor dos antagonistas de NMDAR.

Devido aos resultados promissores dessa classe de compostos, alguns ensaios clínicos foram realizados. O felbamato por exemplo, um bloqueador dos NMDARs altamente seletivo para as subunidades NR1A/NR2B é classificado com um antiepiléptico de segunda geração. Os estudos demonstraram sua eficácia tanto como monoterapia quanto em associações para o tratamento de epilepsias refratárias e em crises de ausência, em doses que variam de 45 a 300 mg/kg (Canger et al., 1999; Devinsky et al., 1994; Theodore et al., 1991). Entretanto sua utilização é limitada e vinculada a acompanhamento por exames laboratoriais devido ao elevado número de efeitos adversos (ataxia, sedação, insônia, anorexia, vômitos, perda de peso, irritabilidade, etc) e pelos riscos de complicações mais graves como anemia aplástica e falência hepática (Pellock, 1999; Pellock et al., 2006). A cetamina é outro antagonista do NMDAR que possui estudos clínicos, e tem sido reportada como eficaz no controle do *SE* refratário (convulsivo e não convulsivo) por via intravenosa e oral. Além disso, seus efeitos adversos aparentam ser raros, embora exista uma inúmera lista de restrições de uso (Fang and Wang, 2015). As restrições incluem um grupo grande de pessoas tendo em vista as sérias complicações que podem ocorrer como sepse, choque, falência de órgãos,

taquicardia, sintomas psiquiátricos, neurotoxicidade, pneumonia, dentre outros (Fang and Wang, 2015; Gaspard et al., 2013). Dessa forma, o tratamento de desordens do SNC com antagonistas do NMDAR foi associado com efeitos colaterais elevados, o que pode se relacionar com o envolvimento paradoxal deste receptor tanto na morte celular quanto na sobrevivência e plasticidade neuronal (Hardingham, 2009; Huang et al., 2012). Estes agentes neuroprotetores bloqueiam completamente o NMDAR, o que garante a prevenção contra a excitotoxicidade, porém causam também prejuízos na transmissão sináptica fisiológica, o que explica os numerosos efeitos indesejados (Danysz and Parsons, 2002; Huang et al., 2012; Loss et al., 2012a; Muir and Lees, 1995).

A memantina (MN) é atualmente empregada na clínica para o tratamento da Doença de Alzheimer, por produzir uma melhora global nos aspectos comportamentais e cognitivos dos pacientes, demonstrando-se eficaz e segura (Huang and Mucke, 2012; Peskind et al., 2006). Neste contexto, a MN representa um exemplo dos potenciais benefícios da utilização clínica de antagonistas NMDAR em desordens do SNC (Lipton, 2006; Zheng et al., 2014). O mecanismo de ação da MN envolve um antagonismo não competitivo de baixa afinidade aos NMDAR. Isso leva a um bloqueio parcial do influxo excessivo de Ca^{+2} decorrente do aumento da atividade do receptor na fenda sináptica, e devido a sua rápida cinética de *turn on/turn off*, a MN não compromete a atividade fisiológica da transmissão glutamatérgica (Johnson and Kotermanski, 2006; Parsons et al., 2008, 2007). Assim, a MN não produz efeitos colaterais tão intensos como aqueles observados no uso de antagonistas seletivos de alta afinidade, como cetamina e outros bloqueadores do NMDAR, sendo melhor tolerada pelos pacientes (Parsons et al., 2008; Rogawski, 1993).

Considerando a eficácia da MN no tratamento da Doença de Alzheimer, e que existem mecanismos na patogênese dessa doença que se assemelham aos encontrados na epilepsia, existe uma possibilidade da aplicação terapêutica da MN reposicionada para pacientes epiléticos (Chin and Scharfman, 2013). Evidências em modelo animal demonstraram que a MN foi capaz de prevenir crises convulsivas na dose de 10 mg/kg/dia durante dois dias, antes da indução da crises epiléticas com NMDA (Chang-Mu et al., 2010). 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 (Mareš and Mikulecká, 2009). Embora os efeitos neuroprotetores da MN não tenham sido investigados em modelos específicos de crises

convulsivas, como o *SE*, pode-se sugerir-la como uma alternativa em potencial para a prevenção de crises e da morte neuronal decorrentes de eventos excitotóxicos. Além disso, os efeitos da MN no controle de crises epilépticas permanece como um tópico controverso na literatura (Creeley et al., 2006; Löscher and Hönack, 1990).

Além da ação sobre os NMDARs, evidências recentes sugerem que a MN atua também no controle do estado redox em diferentes condições patológicas, aumentando seu espectro de ação (efeito multialvo), e em um dos alvos sabidamente envolvidos na patogênese das epilepsias (Bardak et al., 2018; Khalili-Fomeshi et al., 2018; Tanaka et al., 2018).

3. OBJETIVOS

Considerando:

- (i) A importância clínica das epilepsias no que se refere às consequências psicopatológicas e sociais, as altas taxas de refratariedade e a necessidade de novas abordagens terapêuticas para contornar esses problemas;
- (ii) O envolvimento do sistema glutamatérgico na epileptogênese, particularmente relativo aos NMDARs, e os benefícios da modulação do sistema glutamatérgico no tratamento das crises refratárias;
- (iii) A segurança e boa tolerabilidade da MN na prática clínica;
- (iiii) As similaridades patognomônicas entre Alzheimer e epilepsia e os potenciais benefícios da utilização da MN em distúrbios do SNC;

Nós hipotetizamos que a MN poderia ser uma alternativa eficaz no manejo de crises epiléticas, podendo ser reposicionada com sucesso mediante a comprovação de seus efeitos em modelos animais à curto e longo prazos.

3.1. Objetivo geral

Investigar se a MN é capaz de atenuar o fenótipo epilético e as alterações cerebrais e comportamentais relacionadas a crises epiléticas.

3.1.1. Objetivos específicos do capítulo I

- Avaliar o efeito do pré-tratamento e do pós-tratamento com MN na morte neuronal induzida pelo *Status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina em diferentes regiões cerebrais de ratos jovens.

- Avaliar as diferenças no perfil de neuroproteção de uma única dose e de múltiplas doses de MN nas diferentes regiões cerebrais de ratos jovens submetidos ao *Status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina.

3.1.2. Objetivos específicos do capítulo II

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com MN sobre o fenótipo de crises epiléticas induzidas com PTZ em peixe-zebra.

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com MN sobre a expressão de receptores NMDA e estresse oxidativo em animais submetidos a crises epiléticas induzidas por PTZ.

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com MN sobre as alterações comportamentais induzidas por crises epiléticas induzidas por PTZ em peixe-zebra.

PARTE II – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4. CAPÍTULO I

Artigo publicado

Título: Memantine decreases neuronal degeneration in young rats submitted to LiCl-pilocarpine-induced *status epilepticus*

Revista: Neurotoxicology

Qualis-CAPES-CBII: B1

Fator de Impacto: 3.263

Justificativa: O estudo do papel dos antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato demonstra sua ação anticonvulsivante, porém seu papel como neuroprotetores na morte neuronal induzida pelo SE permanece pouco explorado. Além disso, a memantina é clinicamente bem tolerada e não induz tantos efeitos indesejados e a investigação de seus efeitos neuroprotetores é fundamental para a possibilidade de reposicionar este medicamento para o tratamento das epilepsias.

Objetivo geral: O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito neuroprotetor da memantina contra a degeneração neuronal induzida pelo SE induzido por LiCl-pilocarpina nos períodos iniciais da vida.

Resultados: Observamos que a neurodegeneração diminuiu significativamente no hipocampo e no tálamo; o pós-tratamento foi capaz de proteger contra a neurodegeneração em uma região da amígdala. Assim, 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.



Full Length Article

Memantine decreases neuronal degeneration in young rats submitted to LiCl-pilocarpine-induced *status epilepticus*



Kamila Cagliari Zenki^{a,b,*}, Eduardo Kalinine^b, Eduardo R. Zimmer^{b,d,e},
Thainá Garbino dos Santos^{a,b}, Ben Hur Marins Mussulini^{a,c}, Luis Valmor Cruz Portela^b,
Diogo Lösch de Oliveira^{a,b,*}

^a Laboratory of Cellular Neurochemistry, Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Brain Institute (Brains) of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2017

Received in revised form 8 March 2018

Accepted 9 March 2018

Available online 12 March 2018

Keywords:

Status epilepticus

Neuronal death

Excitotoxicity

Neuroprotection

Memantine

ABSTRACT

Several works have demonstrated that *status epilepticus* (SE) induced-neurodegeneration appears to involve an overactivation of *N*-methyl-D-aspartate receptors and treatment with high-affinity NMDAR antagonists is neuroprotective against this brain damage. However, these compounds display undesirable side effects for patients since they block physiological NMDA receptor dependent-activity. In this context, memantine (MN), a well tolerable low-affinity NMDAR channel blocker, will be a promising alternative, since it does not compromise the physiological role of NMDA receptors on synaptic transmission. The aim of the present study was to investigate if MN could attenuate seizure severity and neuronal cell death caused by SE induced early in life. Wistar rats (15 days old; n = 6–8 per group) received memantine (20 mg/kg i.p.) in six different treatments: 6 and 3 h before SE onset; concomitant with pilocarpine; 15 min and 1 h after SE onset; and four consecutive administrations (15 min, 6 h, 12 h, and 18 h) after pilocarpine injection. Neurodegeneration was quantified by fluoro-jade C staining. Treatment with memantine increase latency to SE onset only in groups treated 3 h before or concomitant with pilocarpine. In CA1 hippocampal subfield, memantine significantly reduced neurodegeneration at the following times: 3 h prior SE-onset, concomitant with pilocarpine, and 15 min after pilocarpine injection. For amygdala and thalamus, all post-SE onset treatments were able to decrease neurodegeneration. In conclusion, the present study showed that MN was neuroprotective against SE-induced neuronal death and this neuroprotection appears to be time- and region-dependent.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Status epilepticus (SE) is “a condition resulting either from the failure of the mechanisms responsible for seizure termination or from the initiation of mechanisms, which lead to abnormally, prolonged seizures” (Trinka et al., 2015). It is most prevalent in children than adults and its annual incidence is 10 to 73 episodes/

100,000 children, being more incident in children younger than two years of age (135/100,000 to 156/100,000 children) (Fencel et al., 2000; Majores et al., 2007; Raspall-Chaure et al., 2006).

One of most remarkable SE-induced consequence early in life is a massive neuronal cell death observed in specific brain areas, such as temporal cortex, hippocampus, amygdala and thalamus, which may lead to a long-term alterations in neural network development and thus functional and cognitive deficits at adulthood (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2002; Sankar et al., 1998). Although clinically used antiepileptic drugs, such as midazolam, diazepam, fosphenytoin, valproic acid, levetiracetam, and phenobarbital, have been recommended to stop convulsive SE (Glauser et al., 2016), they have mostly failed to halt SE-induced neuronal

* Corresponding authors at: Department of Biochemistry – ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: kamizenki@gmail.com (K.C. Zenki), losch@ufrgs.br (D.L. de Oliveira).

degeneration (Abdalla et al., 2014; Ahmed et al., 2011; Kalemenev et al., 2016; Trinka et al., 2015).

SE-induced neuronal degeneration appears to involve an overactivation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) (Holopainen, 2008) and treatment with high-affinity NMDAR antagonists, such as TCP, ketamine and MK-801, has been showed to be effective for preventing SE-induced neuronal death (Brandt et al., 2003; Lerner-Natoli et al., 1991; Stafstrom et al., 1997). However, preventive protection of NMDAR antagonists seems to have a short “therapeutic time window”, since this drugs were efficacious only when they were administered prior or up to 15 min after SE onset (Fujikawa, 1995; Fujikawa et al., 1994; Loss et al., 2012). Furthermore, clinical use of high-affinity NMDAR antagonists is not recommended. High-affinity NMDAR antagonists cut off normal glutamatergic neurotransmission (Lipton, 2004), causing thus severe and undesirable side effects for patients (Danysz and Parsons, 2002; Muir and Lees, 1995).

In this context, memantine (MN) has been proposed as an effective NMDAR channel blocker (Chen and Lipton, 2006). The pharmacodynamics of MN involves NMDAR fast blocking/unblocking kinetics and strong voltage-dependency. These characteristics culminate in a partial blockage of NMDAR, which does not compromise the physiological and neurochemical role of these receptors on synaptic neurotransmission (Johnson and Koterman-ski, 2006; Parsons et al., 2007; Rammes et al., 2008). Moreover, MN appears to be more tolerable for patients than classical high-affinity NMDAR antagonists (Chen and Lipton, 2006; Parsons et al., 1999; Parsons et al., 2007). Recently, memantine was approved by the Food and Drug Administration to treat moderate-to-severe Alzheimer's disease (Parsons et al., 2007).

Taking into account that NMDAR overactivation may be implicated in SE-induced neurodegeneration and memantine is a well tolerable partial NMDAR channel blocker, the aim of the present study was to investigate if MN could attenuate seizure severity and neuronal cell death induced by SE early in life.

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 and thirtythree young Wistar rats were obtained from local breeding. The litters were culled to 7 pups. Each litter contained animals from all experimental groups and was composed of 1:1 male/female ratio approximately. Animals were housed under controlled environment: light/dark photoperiod cycle of 12/12 h (lights on at 7:00 a.m.) and room temperature of 21 ± 2 °C. N was 6–8 animals/group. 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 treatment interventions

Rat pups (15 days old) were injected (10 ml/kg) with LiCl (3 mEq/kg; i.p.) 15 h prior to pilocarpine (60 mg/kg; i.p.; SE group) or saline (0.9% NaCl; i.p.; non-SE group) administrations. According to our previous works (de Oliveira et al., 2011; Loss et al., 2012), this pilocarpine dose causes SE in all animals without induces high mortality rate. Memantine (MN) (20 mg/kg; i.p.) (Chen et al., 1998; Stieg et al., 1999) or saline (0.9%) were administrated in both SE-

and non-SE groups in six different therapeutic regimens: (I) 6 and (II) 3h prior to pilocarpine injection; (III) concomitant with pilocarpine injection; (IV) 15 min and (V) 1h after pilocarpine injection; and (VI) four consecutive administrations of MN (15 min, 6 h, 12 h, and 18 h) after pilocarpine injection (Supplementary Fig. S1). Treated rats were kept in individual plastic cages during 3 h for seizure observation. Behavioral manifestations of seizure were recorded and scored accordingly to Racine scale (Racine, 1972). After this period, animals returned to home cages and were observed for more 1 h for seizure recovery. Animals spontaneously recovered from SE without anticonvulsant administration. Twenty-four hours after SE induction, animals were used to determine neuronal degeneration.

2.4. Fluoro-jade C staining

For evaluating neuronal degeneration, Fluoro-jade C staining (FJC) was conducted as described by Schmued et al. (2005). Briefly, 24 h after SE induction rats were deeply anesthetized i.p. with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) and sequentially perfused through the heart with 200 mL of ice-cold 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, followed by 100 mL of ice-cold fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4). Brains were removed and immersed overnight in fixative solution followed by 30% sucrose until brains sank to the bottom of the chamber. Coronal slices (30 μ m) were obtained using a Leica VT 1000S vibroslicer, mounted on to gelatin-coated slides and dried at room temperature overnight. Slides were immersed in alcohol solution consisting of 1% sodium hydroxide in 80% ethanol for 5 min. Then, slides were rinsed for 2 min in 70% ethanol, 2 min in distilled water, and then incubated in 0.06% potassium permanganate solution during 10 min. After rinsing with distilled water for 2 min, slides were transferred for 10 min to a 0.0001% FJC solution dissolved in 0.1% acetic acid, washed three times for 1 min with distilled water, dried at room temperature overnight, dehydrated in xylene, and cover slipped. Sections were analysed using a Nikon Eclipse E600 epifluorescence microscope.

Total number of FJC-positive cells per animal corresponds to an average of 3 consecutive coronal brain sections from plates 31–33 of Paxinos and Watson's Atlas (1998). Cells were counted at 200x magnification by using the software NIS-Elements Version 3.10 (Nikon Instruments Inc., USA). Only cells exhibiting bright green fluorescence and neuronal profile were counted (Wang et al., 2008). Brain regions analysed were thalamus, amygdala and hippocampus, which were chosen accordingly to previous studies (de Oliveira et al., 2008; Kubova et al., 2002).

2.5. Statistical analysis

All data were first tested for normality by D'Agostino-Pearson omnibus normality test. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test was used to analyse latency to SE onset and results were expressed as mean \pm S.E.M. Mann–Whitney U-test was used to analyse FJC data and results were expressed as median (interquartile range). $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Systemic administration of LiCl-pilocarpine produced defecation, salivation, body tremor, and scratching within 5 to 10 min. This behavioral pattern progressed within 20 to 45 min to increased levels of motor activity and culminated in SE in all animals. SE was characterized by sustained orofacial automatisms, salivation, chewing, forelimb clonus, loss of the righting reflex and falling, and lasting up to 3–4 h. Treatment with MN increased the latency to generalized motor convulsions (stage 5 of Racine scale)

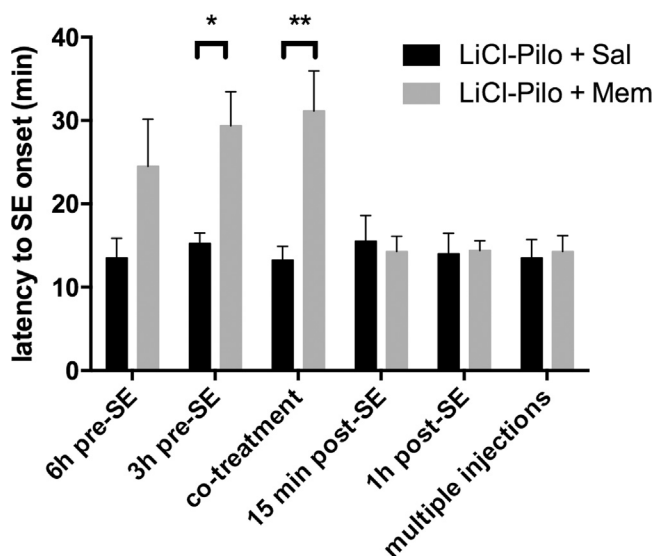


Fig. 1. Latency to SE (*status epilepticus*) in minutes characterizing seizure behavioral pattern. Black bars represented animals that received vehicle and pilocarpine and grey bars animals that received memantine and pilocarpine. Data were expressed with mean + S.E.M. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

only when it was administered 3h before or concomitant with pilocarpine ($p = 0.0385$ and $p = 0.0055$, respectively; Fig. 1). For the other Racine stages, MN had no effect. Additionally, MN treatment was not able to decrease mortality rates.

FJC-positive cells exhibited a bright green color in the soma and in the fine neuronal processes (Figs. 2 and 3; insets showing higher magnification view). Twenty-four hours after SE onset, animals treated with LiCl-pilocarpine+saline presented an expressive neuronal degeneration in CA1 and DG hippocampal subfields, as well as in posteroventral medial nucleus (MePV) of amygdala and ventral posteromedial nucleus (VPM) of thalamus (Figs. 2 and 3). Pre- and post- therapeutic regimens with MN did not reduce the number of FJC-positive neurons in DG (Fig. 2; Table 1). In contrast, the number of FJC-positive cells in CA1 subfield was significantly reduced when animals were treated with MN 3h before, concomitant or 15 min after pilocarpine administration ($p = 0.008$, $p = 0.024$ and $p = 0.002$, respectively) (Fig. 2; Table 1). At 1h after pilocarpine or multiple injections regimen, MN did not reduce the number of FJC-positive cells in CA1 subfield.

In MePV nucleus of amygdala, MN administered 15 min or 1 h after pilocarpine reduced significantly the number of FJC-positive neurons ($p = 0.001$ and $p = 0.004$, respectively). Moreover, in this brain region a protective effect was also observed when MN was administered in a multiple injections regimen ($p = 0.017$) (Fig. 3; Table 1).

For VPM nucleus of thalamus, MN was protective in all treatment regimens (Fig. 3; Table 1).

None FJC-positive neurons were observed in non-SE animals treated with saline or MN (data not shown).

4. Discussion

Massive neuronal cell death is one of the most remarkable consequences of SE for the developing brain. It has been considered a critical signal to induce abnormal axonal sprouting and synaptic-circuit reorganization, which have been pointed as a structural and functional basis for behavioral and cognitive dysfunctions observed in adult epileptic patients. Neuronal cell death induced by SE appears to involve an overactivation of NMDAR (Holopainen,

2008) and treatment with NMDAR antagonists, such as MK-801 and ketamine, was shown to prevent SE-induced neurodegeneration in several experimental models (Brandt et al., 2003; Lerner-Natoli et al., 1991; Stafstrom et al., 1997). However, clinical use of high-affinity NMDAR antagonists is not recommended, since they can block physiological glutamatergic neurotransmission causing severe and undesirable side effects for patients (Danysz and Parsons, 2002; Lipton, 2004; Muir and Lees, 1995).

In this context, development and testing drugs that potentially prevent SE-induced neurodegeneration without, however, affecting normal neurotransmission can be crucial for clinical management of pediatric SE. In present work, we showed that MN, an effective NMDAR channel blocker with fast blocking/unblocking kinetics, was able to reduce SE-induced neuronal degeneration in the developing brain. MN neuroprotection was time- and region-dependent and may be attributed to its capacity of blocking GluN2A- and GluN2B-containing NMDAR, which are highly expressed in immature brain (Monyer et al., 1994; Paoletti et al., 2013).

MN neuroprotection observed in CA1 subfield may represent the ability of MN bind to channels formed by these both NMDAR subunits, since Bresink et al. (1996) and Parsons et al. (1999) have demonstrated that MN was equipotent for blocking glutamate-induced currents mediated by GluN2A- and GluN2B-containing NMDAR in hippocampal slices. However, we observed a complete lack of neuroprotection in DG. This can be attributed to a later NMDA receptor maturation in this region. According to Bekenstein and Lothman (1991), hippocampal NMDA receptor dependent-LTP reaches the adult values about two weeks after birth in CA1, while for DG this value is reached only about 3 weeks after birth. Since our animals are two-weeks old, NMDAR functional immaturity can confer a reduced sensibility of DG to MN, which would preclude its neuroprotective action (McDonald et al., 1990).

Post-SE onset treatments in amygdala and thalamus showed a highest neuroprotective effect of MN. Comparatively with the hippocampus, there is a massive expression of GluN2B subunits in amygdala and thalamus during the first and second weeks of life in rats (Lopez de Armentia and Sah, 2003). Since MN present high affinity for GluN2B subunits, neuroprotective effects observed in these regions probably can be attributed to this increased expression of GluN2B subunits (Grimwood et al., 1996).

Surprisingly, MN also showed a prominent neuroprotection in VPM. This neuroprotection can be attributed to distinct compositions of NMDAR subunits in thalamus. For instance, Paoletti et al. (2013) have shown that the expression of NMDAR subunits in thalamus during brain development comprises GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B and GluN1/GluN2D and literature have reported that MN is particularly able to interact with all of these functional isoforms (Parsons et al., 2007).

Excitotoxicity caused by excessive neuronal activity has been proposed as molecular mechanism implicated in SE-induced neuronal cell death (Choi, 1992). This pathological process is mediated mainly by an overactivation of NMDA receptors, which can lead to an excessive calcium entry into neuronal cytosol and a subsequent activation of proteases, phospholipases and endonucleases (Szado et al., 2008; Wang et al., 1999). Neuronal cell death can also be induced by an elevation of $[Ca^{2+}]_i$, which may be mediated by Ca^{2+} release from IP3- and ryanodine-sensitive calcium stores (Deshpande et al., 2016; Deshpande et al., 2014). Moreover, SE also can disrupt glial glutamate uptake and reduce Na^+/K^+ ATPase activity (de Oliveira et al., 2011), which may lead to an elevation of glutamate levels on synaptic cleft and, subsequently, an exacerbation of excitotoxic neuronal injury (Rothman and Olney, 1995; Yan et al., 2013). Since excitotoxicity has been proposed to be one of the molecular mechanisms involved in SE-induced neuronal cell death, NMDAR channel-blockers that do not

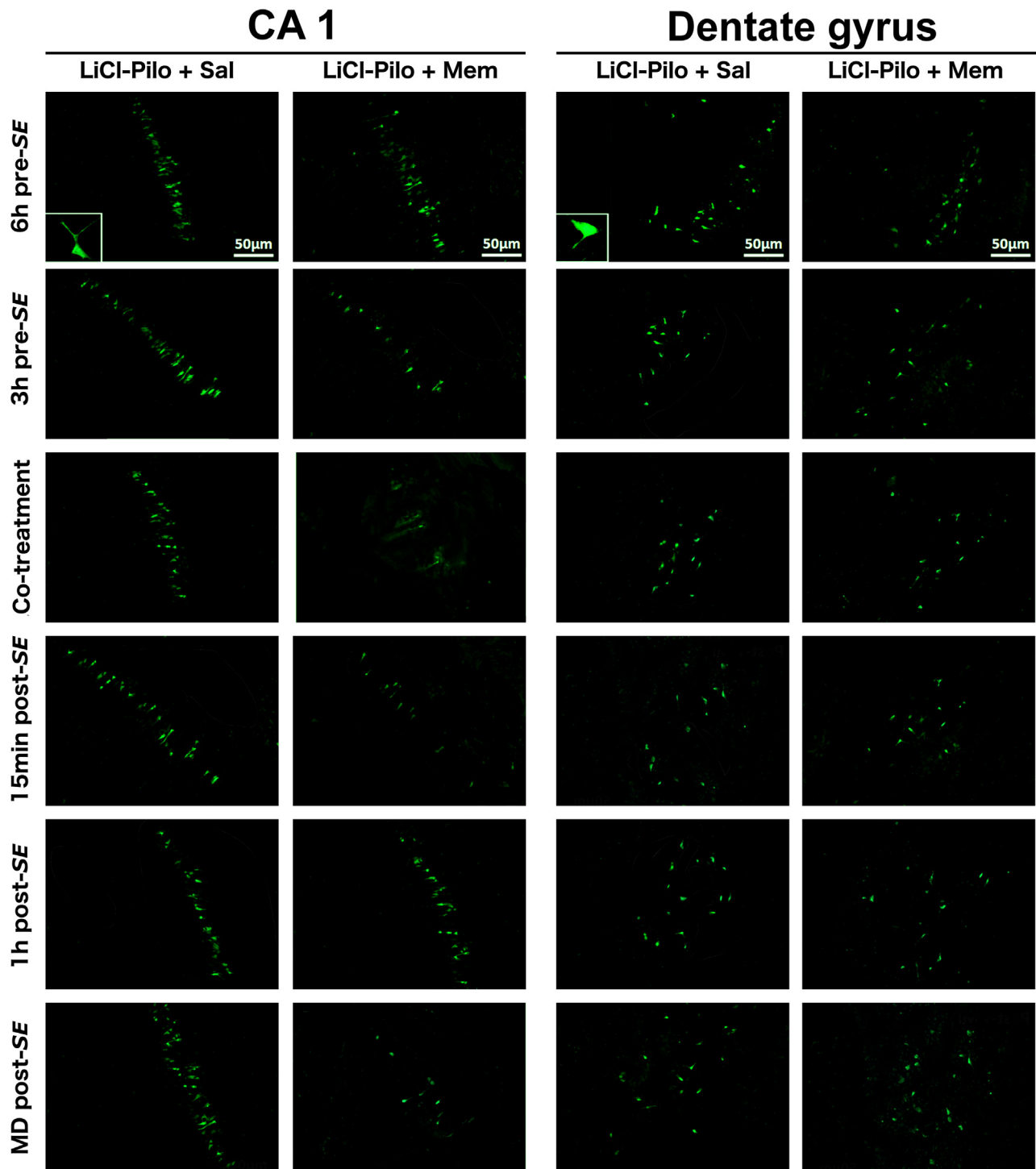


Fig. 2. Representative images of the MN effect on SE-induced neuronal degeneration in hippocampal CA1 and dentate gyrus (DG). FJC-positive cells were quantified 24 h after administration of LiCl-pilocarpine. Images are at 200 \times magnification.

impair physiological neurotransmission could be considered as an adjuvant therapy for SE-induced neurodegeneration. This notion can be reinforced by the fact that clinically used antiepileptic drugs have a time-dependent loss of effectiveness against SE-induced brain injury, i.e. they are protective only when they are administered early or immediately after SE onset (George and Kulkarni, 1996; Kim et al., 2007; Mazarati et al., 1998; Morrisett et al., 1987; Sofia et al., 1993). Few AEDs exhibit significant neuroprotection against SE-induced neuronal damage when they

are administered after SE onset (Abdalla et al., 2014; Kalemenev et al., 2016).

In our study, we showed that MN was able to reduce neuronal damage in thalamus and amygdala even when it was administered at a single injection after SE onset. Neuroprotection was also observed when it was administered at a post-SE multiple injection therapeutic regimen. These findings have a potential clinical value, since classical AEDs failed into protect the brain from SE-induced neuronal damage (Temkin, 2009). Neuroprotection following brain

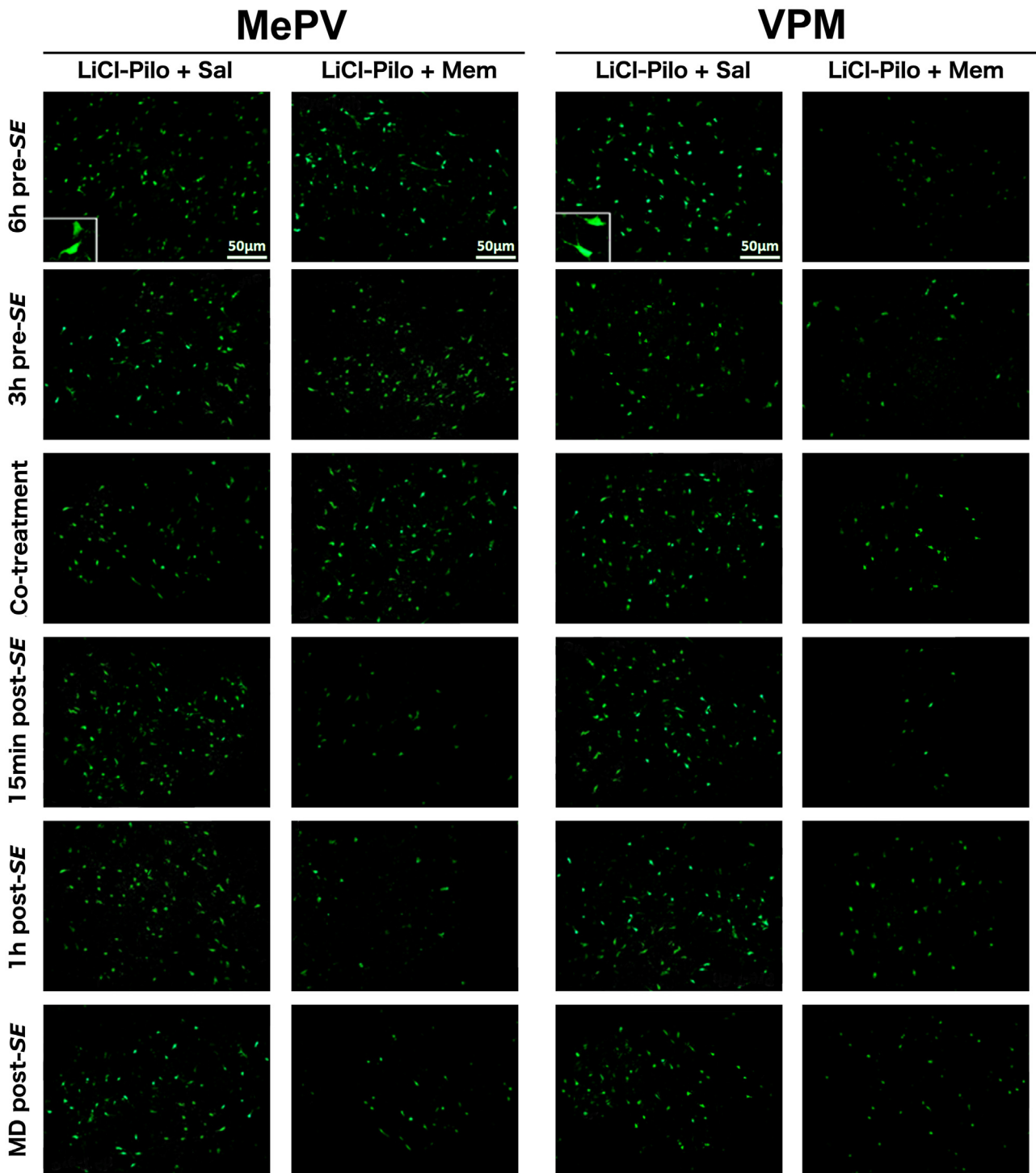


Fig. 3. Representative images of the MN effects on SE-induced neuronal degeneration. MePV: posteroventral medial amygdaloid nucleus; VPM: ventral posteromedial thalamic nucleus. FJC-positive cells were quantified 24 h after administration of LiCl-pilocarpine. Images are at 200x magnification.

insults does not seem to provide a promising strategy to prevent epilepsy, but may reduce or prevent other consequences of brain insults, such as cognitive deficits or psychopathology in adulthood (Loscher and Brandt, 2010).

Several NMDAR antagonists, including MN, exert anticonvulsant activity in some animal models. Dhir and Chopra (2015) demonstrated that MN pre-treatment delayed the onset of different phases of NMDA-induced convulsions in neonatal rats at dose-dependent manner. Moreover, MN also suppressed

generalized tonic-clonic PTZ-induced seizures in immature rats (Mares and Mikulecka, 2009). However, in our study MN does not seem to be a promising strategy to stop LiCl-pilocarpine-induced seizures, although it increased latency to generalized motor convulsions. This distinct anticonvulsant profile of MN can be associated with peculiarities of each seizure-induced animal model, such as type of induced-seizure and chemoconvulsant target site (Kupferberg, 2001). Despite this controversial anticonvulsant activity, as well as some intolerable side effects (Creeley

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	Statistical significance
CA1	Pre-T 6 h	16 (14:20)	17 (4:24)	n.s.
	Pre-T 3 h	14 (10:19)	9 (6:12)	P = 0.008
	Co-T 0 h	12 (8:14)	6 (3:8)	p = 0.024
	Post-T 15 min	13 (11:16)	6 (2:9)	p = 0.002
	Post-T 1 h	16 (15:21)	18 (14:27)	n.s.
	Post-T MD	15 (9:24)	9 (7:11)	n.s.
DG	Pre-T 6 h	12 (8:20)	11 (9:18)	n.s.
	Pre-T 3 h	15 (10:21)	14 (9:22)	n.s.
	Co-T 0 h	14 (10:19)	16 (11:18)	n.s.
	Post-T 15 min	12 (7:18)	14 (9:17)	n.s.
	Post-T 1 h	15 (7:22)	11 (6:22)	n.s.
	Post-T MD	13 (6:18)	14 (9:20)	n.s.
MePV	Pre-T 6 h	266 (217:284)	281 (201:361)	n.s.
	Pre-T 3 h	269 (149:400)	201 (154:298)	n.s.
	Co-T 0 h	272 (193:304)	247 (169:410)	n.s.
	Post-T 15 min	325 (161: 425)	43 (0:107)	p = 0.001
	Post-T 1 h	274 (194:415)	49 (18:203)	p = 0.004
	Post-T MD	267 (169:389)	32 (8:196)	p = 0.017
VPM	Pre-T 6 h	114 (92:120)	72 (53:79)	p = 0.001
	Pre-T 3 h	125 (104:132)	46 (40:54)	p = 0.001
	Co-T 0 h	113 (91:166)	41 (25:55)	p = 0.001
	Post-T 15 min	102 (81:137)	19 (0:63)	p = 0.001
	Post-T 1 h	113 (78:159)	49 (18:138)	p = 0.031
	Post-T MD	157 (91:195)	41 (27:130)	p = 0.026

Data were expressed as median (interquartile range).

et al., 2006; Loscher and Honack, 1990), MN may be a very promising therapeutic strategy for ameliorates cognitive impairments associated with early-life SE. Post-treatment with MN prevented impaired exploratory behavior and spatial memory deficits, and a decline of spatial memory-extinction in pilocarpine-induced SE (Kalemenev et al., 2016).

Our data suggest that cellular mechanisms underlying seizure maintenance and neurodegeneration at LiCl-pilocarpine-induced SE involve distinct signaling pathways. To analyse the mechanisms responsible for sustained SE, it is necessary to know exactly the brain regions involved and mechanisms of seizure propagation in pilocarpine model, especially because we demonstrated that MN exerts region-dependent effects. For example, *substantia nigra* is a crucial site of anticonvulsant activity, while forebrain and hindbrain areas had no significant contribution (Iadarola and Gale, 1982; Lado and Moshe, 2008) and this could limit the full effect of MN. Differences between pharmacodynamics of MN and others NMDAR antagonists have been proposed to more potent inhibition of extrasynaptic than synaptic NMDAR by MN (Parsons et al., 2007; Xia et al., 2010; Zhou et al., 2013). MN binding depends upon intracellular calcium concentration and thus on the intensity of NMDAR activation, as well as on duration of glutamate exposure in an NMDAR subtype-dependent manner, and compared to others NMDAR antagonists, differentially alter NMDAR desensitization (Glasgow et al., 2017). Thus, kinetic properties also could contribute to less efficiency to MN for stop seizure. Furthermore, MN (6–10 μ M) did not attenuate LTP in hippocampal slices and substantially spared the NMDA component of excitatory postsynaptic currents, while MK-801 at same concentrations or APV (50 μ M) completely blocked these events (Chen et al., 1998). Thus, we hypothesized that MN promotes fewer anticonvulsive effects through NMDAR-mediated overactivity, displaying a less pronounced effect than other NMDAR antagonists, due to the more rapid unblocking rate of MN.

In summary, our results showed that treatment with MN was able to protect the brain against SE-induced neuronal damage in a

time- and spatial-dependent manner. Since MN is an FDA-approved drug, our experimental data may point to the putative use of this drug in futures prospective clinical trials involving neuroprotection against SE-induced brain damage.

Conflict of interest statement

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), FAPERGS/PRONEX – No. 16/2551-0000499-4, CNPq – Edital Doenças Neurodegenerativas No. 467676/2014-3.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.005>.

References

- Abdalla, F.H., Schmatz, R., Cardoso, A.M., Carvalho, F.B., Baldissarelli, J., de Oliveira, J.S., Rosa, M.M., Goncalves Nunes, M.A., Rubin, M.A., da Cruz, I.B., Barbisan, F., Dressler, V.L., Pereira, L.B., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Goncalves, J.F., Mazzanti, C.M., 2014. Quercetin protects the impairment of memory and angiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiol. Behav.* 135, 152–167.
- Ahmed, O., Seguin, D., Gerlai, R., 2011. An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 216 (1), 166–171.
- Bekstein, J.W., Lothman, E.W., 1991. An in vivo study of the ontogeny of long-term potentiation (LTP) in the CA1 region and in the dentate gyrus of the rat hippocampal formation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 63 (1-2), 245–251.
- 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 (3), 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 (2), 195–204.
- Chen, H.S., Lipton, S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97 (6), 1611–1626.
- Chen, H.S., Wang, Y.F., Rayudu, P.V., Edgewood, P., Neill, J.C., Segal, M.M., Lipton, S.A., Jensen, F.E., 1998. Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 86 (4), 1121–1132.
- Choi, D.W., 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23 (9), 1261–1276.
- Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J. Neurosci.* 26 (15), 3923–3932.
- Danysz, W., Parsons, C.G., 2002. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotoxic. Res.* 4 (2), 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⁺/K⁺ 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., de 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 (5), 842–852.
- Deshpande, L.S., Blair, R.E., Huang, B.A., Phillips, K.F., DeLorenzo, R.J., 2016. Pharmacological blockade of the calcium plateau provides neuroprotection following organophosphate paraoxon induced status epilepticus in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 56, 81–86.
- Deshpande, L.S., Carter, D.S., Phillips, K.F., Blair, R.E., DeLorenzo, R.J., 2014. Development of status epilepticus, sustained calcium elevations and neuronal injury in a rat survival model of lethal paraoxon intoxication. *Neurotoxicology* 44, 17–26.
- Dhir, A., Chopra, K., 2015. Memantine delayed N-methyl-D-aspartate -induced convulsions in neonatal rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29 (1), 72–78.
- Fencel, V., Jabor, A., Kazda, A., Figge, J., 2000. Diagnosis of metabolic acid-base disturbances in critically ill patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162 (6), 2246–2251.
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36 (2), 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 (3), 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 (5), 335–340.
- Glasgow, N.G., Povyshva, N.V., Azofeifa, A.M., Johnson, J.W., 2017. Memantine and ketamine differentially alter NMDA receptor desensitization. *J. Neurosci.* 37 (40), 9686–9704.
- Glauser, T., Shinnar, S., Gloss, D., Alldredge, B., Arya, R., Bainbridge, J., Bare, M., Bleck, T., Dodson, W.E., Garrity, L., Jagoda, A., Lowenstein, D., Pellock, J., Rivielo, J., Sloan, E., Treiman, D.M., 2016. Evidence-based guideline: treatment of convulsive status epilepticus in children and adults: report of the guideline committee of the American epilepsy society. *Epilepsy Curr.* 16 (1), 48–61.
- Grimwood, S., Gilbert, E., Ragan, C.I., Hutson, P.H., 1996. Modulation of 45Ca²⁺ influx into cells stably expressing recombinant human NMDA receptors by ligands acting at distinct recognition sites. *J. Neurochem.* 66 (6), 2589–2595.
- Holopainen, I.E., 2008. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem. Int.* 52 (6), 935–947.
- Iadarola, M.J., Gale, K., 1982. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 218 (4578), 1237–1240.
- Johnson, J.W., Kotermanski, S.E., 2006. Mechanism of action of memantine. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (1), 61–67.
- Kalemenev, S.V., Zubareva, O.E., Sizov, V.V., Lavrent'eva, V.V., Lukomskaia, N.Y., Kim, K.K., Zaitsev, A.V., Magazanik, L.G., 2016. Memantine attenuates cognitive impairments after status epilepticus induced in a lithium-pilocarpine model. *Dokl. Biol. Sci.* 470 (1), 224–227.
- 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.
- Kupferberg, H., 2001. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 42 (Suppl. 4), 7–12.
- Lado, F.A., Moshe, S.L., 2008. How do seizures stop? *Epilepsia* 49 (10), 1651–1664.
- 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 (2), 174–178.
- Lipton, S.A., 2004. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1 (1), 101–110.
- 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 (17), 6876–6883.
- Loscher, W., Brandt, C., 2010. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* 62 (4), 668–700.
- Loscher, W., Honack, D., 1990. High doses of memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane) induce seizures in kindled but not in non-kindled rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341 (5), 476–481.
- 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.
- 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 (1), 32–39.
- 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 (1–2), 179–185.
- McDonald, J.W., Johnston, M.V., Young, A.B., 1990. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 110 (3), 237–247.
- 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 (3), 529–540.
- Morrisett, R.A., Jope, R.S., Snead 3rd, O.C., 1987. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp. Neurol.* 97 (1), 193–200.
- Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26 (3), 503–513.
- Paolletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (6), 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 (1), 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 (6), 699–723.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (3), 281–294.
- Rammes, G., Danysz, W., Parsons, C.G., 2008. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr. Neuropharmacol.* 6 (1), 55–78.
- 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 (9), 769–779.
- Rothman, S.M., Olney, J.W., 1995. Excitotoxicity and the NMDA receptor—still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* 18 (2), 57–58.
- 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 (20), 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 (1), 24–31.
- 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 (3), 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 (2), 335–344.
- Stieg, P.E., Sathi, S., Warach, S., Le, D.A., Lipton, S.A., 1999. Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur. J. Pharmacol.* 375 (1–3), 115–120.
- Szado, T., Vanderheyden, V., Parys, J.B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Chastre, E., Khan, F., Landegren, U., Soderberg, O., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (7), 2427–2432.
- Temkin, N.R., 2009. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 50 (Suppl. 2), 10–13.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 56 (10), 1515–1523.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C., 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284 (5412), 339–343.

- 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.
- Xia, P., Chen, H.S., Zhang, D., Lipton, S.A., 2010. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J. Neurosci.* 30 (33), 11246–11250.
- Yan, D., Yamasaki, M., Straub, C., Watanabe, M., Tomita, S., 2013. Homeostatic control of synaptic transmission by distinct glutamate receptors. *Neuron* 78 (4), 687–699.
- Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., Wang, H., 2013. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Dis.* 4, e560.

5. CAPÍTULO II

Artigo submetido

Título: Memantine attenuates seizure severity, reduces oxidative brain damage and prevents anxiety-like behaviors in PTZ-treated adult zebrafish.

Revista: Neuropharmacology

Qualis-CAPES-CBII: A1

Fator de Impacto: 4.38

Justificativa: Apesar de algumas evidências apontarem para a eficácia da MN como anticonvulsivante, a investigação de seus efeitos neuroquímicos e comportamentais de longo prazo perante as crises é fundamental para que sua utilização como fármaco reposicionado para o tratamento das epilepsias seja vantajosa. Assim, a comprovação de seus efeitos multialvo e uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados a sua eficácia podem reforçar os benefícios

Objetivo geral: O objetivo deste trabalho foi investigar se a MN é capaz de prevenir as crises convulsivas induzidas por PTZ em peixe-zebra adulto, bem como se esse tratamento pode modular as alterações neuroquímicas e comportamentais neste modelo.

Resultados: Observamos que o tratamento com MN reduziu a expressão relativa da subunidade GluN2A do NMDAR. Demonstramos que a convulsão induzida por PTZ aumenta a carbonilação e a atividade da SOD, e o tratamento com MN foi capaz de prevenir esse dano oxidativo. Os animais submetidos às crises com PTZ apresentaram maior tempo gasto na zona branca em no aparato claro/escuros e a MN impediu essa anormalidade comportamental.

NEURO PHARMACOLOGY

Contact us Help ?

Username: kamizenki@gmail.com
Switch To: Author Go to: My EES Hub

Version: EES 2015

Submissions Being Processed for Author Kamila Cagliari Zenki

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Memantine attenuates seizure severity, reduces oxidative brain damage and prevents anxiety-like behaviors in PTZ-treated adult zebrafish	Nov 13, 2019	Nov 13, 2019	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

PARTE III – DISCUSSÃO GERAL

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos se a MN foi capaz de atenuar o fenótipo de crises epiléticas bem como reduzir as alterações cerebrais e comportamentais relacionadas a elas. Esta abordagem foi escolhida a fim de proporcionar embasamento que justifique o uso *off-label* reposicionado deste fármaco multialvo no manejo das crises epiléticas. A morte neuronal induzida pelo SE parece envolver uma superativação do NMDAR (Holopainen, 2008) e o tratamento com antagonistas, como MK-801 e cetamina, mostrou prevenir a neurodegeneração induzida por SE em diversos modelos experimentais (Brandt et al., 2003; Lerner-Natoli et al., 1991; Loss et al., 2012b; Stafstrom et al., 1997). Tendo em vista que o uso clínico de antagonistas NMDAR de alta afinidade não é recomendado, uma vez que podem bloquear a neurotransmissão glutamatérgica fisiológica, causando efeitos colaterais graves e indesejáveis para os pacientes (Danysz and Parsons, 2002; Lipton, 2006; Muir and Lees, 1995), nós optamos por utilizar o antagonista MN, de baixa afinidade e com rápida cinética de bloqueio/desbloqueio do NMDAR, providenciando uma alternativa interessante para o manejo clínico do SE.

Apesar das controvérsias acerca dos efeitos benéficos da MN (Creeley et al., 2006; Löscher and Hönack, 1990), já foi demonstrado o seu efeito preventivo contra crises convulsivas induzidas pela administração de NMDA em ratos jovens (Dhir and Chopra, 2015) e a supressão de crises generalizadas induzidas por PTZ (Mareš and Mikulecká, 2009) e por organofosforados (McLean et al., 1992). Nossos dados corroboram com estes achados e suportam a hipótese de que a MN é capaz de atenuar as crises epiléticas por ser efetiva no controle do balanço excitatório/inibitório, atuando como um bloqueador de NMDAR. Nós demonstramos isto no primeiro capítulo, no qual o tratamento com MN foi capaz de aumentar a latência para as convulsões motoras no modelo de pilocarpina em ratos (estágio 5 da escala de Racine). E confirmamos esta propriedade no segundo capítulo, no qual todos os regimes terapêuticos testados diminuíram a intensidade das crises epiléticas induzidas por PTZ em peixe-zebra. Particularmente, MN 50 mg/Kg aumentou a latência para atingir o estágio 4 (fenótipo semelhante à crise clônica), além de diminuir o tempo necessário para o retorno ao nado normal. Além disso, nós reportamos que a MN foi capaz de abolir o estágio 5 em cerca de 20% dos animais.

Como demonstrado pelos nossos dados, o tratamento com MN não parece ser uma estratégia promissora para interromper o *SE*, apesar de atenuar o fenótipo das crises. Assim, nós confirmamos a hipótese de que o efeito anticonvulsivo e a neuroproteção não são eventos interdependentes e interrelacionados. Os efeitos anticonvulsivos e neuroprotetores são comumente dissociados porque, embora convulsões ou *SE* sejam prevenidos ou significativamente atenuados por uma terapia antiepiléptica bem-sucedida, os efeitos neuroprotetores raramente são satisfatórios (Hoffman et al., 2003; Velísek and Velísková, 2008). Além disso, o uso de MN pode ser muito promissor para correção de prejuízos cognitivos associados ao *SE* (Kalemenev et al., 2016). No entanto, os efeitos da MN no estado psicoemocional dos animais permanece como um tópico controverso, a qual se atribui efeitos indesejáveis nas doses neuroprotetoras (Creeley et al., 2006).

No primeiro capítulo desta tese, mostramos que a MN foi capaz de reduzir a degeneração neuronal induzida pelo *SE* no cérebro em desenvolvimento e que este perfil de neuroproteção foi dependente do tempo e da região cerebral. A neuroproteção da MN observada na região CA1 pode estar associado à sua capacidade de ligar-se a NMDARs formados pelas subunidades GluN2A e GluN2B, as quais estão relacionados a eventos excitotóxicos. Bresink e colaboradores (1996) e Parsons e colaboradores (1999) demonstraram que a MN é equipotente para bloquear as correntes induzidas por glutamato via NMDARs contendo GluN2A e GluN2B em fatias do hipocampo. Entretanto, observamos uma completa falta de neuroproteção no DG. Isso pode estar relacionado à imaturidade dos NMDARs nos animais de 15 dias de vida nesta região. Diferentemente do CA1, no qual a completa a maturação funcional ocorre 2 semanas após o nascimento, no DG ocorre cerca de 3 semanas após o nascimento (Bekenstein and Lothman, 1991). Assim, a imaturidade funcional dos NMDARs no DG seria consequência do desenvolvimento ontogênico do NMDAR, o que modula diferencialmente a sensibilidade do NMDAR ao glutamato, e explica as diferenças no perfil de excitotoxicidade e neuroproteção em CA1 e DG (McDonald and Johnston, 1990). A excitotoxicidade mediada por glutamato pode ter relação com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou redução das defesas antioxidantes que levam ao estresse oxidativo, e por conseguinte culminam na morte neuronal (Ambrogini et al., 2019; Puttachary et al., 2015). Além disso, já foi demonstrado que a ativação do NMDAR induz o estresse oxidativo mediado pelo ânion superóxido gerado pelo excessivo influxo de íons cálcio através deste receptor, levando a morte neuronal (Gao et

al., 2007; Reyes et al., 2012; Singh et al., 2003). O papel crucial das espécies reativas de oxigênio nos desfechos de morte neuronal associados à crises epiléticas fazem pensar que uma terapia multialvo interessante e promissora para epilepsia poderia contribuir para a redução da produção destas espécies reativas (Patel, 2016; Rao et al., 2006). Assim, no segundo capítulo desta tese nós demonstramos que as crises epiléticas induzidas por PTZ aumentaram a carbonilação de proteínas e a atividade da enzima SOD, um indicativo de dano oxidativo. A MN apresentou um efeito antioxidante, evitando essas alterações.

Os resultados dessa tese demonstram que a MN é um fármaco multialvo capaz de providenciar neuroproteção contra o evento excitotóxico e de proteger contra o estresse oxidativo relacionado às crises. Outros trabalhos já demonstraram que a MN é capaz de proteger contra a excitotoxicidade glutamatérgica inibindo o excesso de cálcio intracelular, pois diminui o influxo através do NMDAR e modula a liberação de ‘pools’ internos (Glasgow et al., 2017; Jiang et al., 2010; Prentice et al., 2015), e/ou modulando parâmetros relacionados ao estresse oxidativo *in vivo* (Bardak et al., 2018; Khalili-Fomeshi et al., 2018; Tanaka et al., 2018). Surpreendentemente, a MN apresentou efeito neuroprotetor no tálamo e na amígdala nos regimes de pós tratamento. Nessa perspectiva, a utilização de antagonistas do NMDAR que não prejudicam a neurotransmissão fisiológica, como a MN, pode ser considerada promissora como uma terapia adjuvante para a morte neuronal induzida pela SE. Isto é particularmente importante pois as drogas antiepiléticas usadas clinicamente têm uma perda de eficácia dependente do tempo contra lesão cerebral induzida pelo SE, ou seja, são protetoras apenas quando administradas precocemente ou imediatamente após o início da crise (George and Kulkarni, 1996; Kim et al., 2007; Mazarati et al., 1998; Sankar et al., 1998b; Sofia et al., 1993). Poucos antiepiléticos exibem neuroproteção significativa contra danos neuronais, especialmente quando administrados após o início da SE (Abdalla et al., 2014; Kalemenev et al., 2016). Dessa forma, nossos achados têm um impacto clínico potencial, uma vez que os antiepiléticos clássicos falharam em proteger o cérebro dos danos neuronais induzidos pelo SE (Temkin, 2009). A neuroproteção após insultos cerebrais não parece fornecer uma estratégia promissora para prevenir a epilepsia, mas pode reduzir ou prevenir outras consequências dos insultos cerebrais, como déficits cognitivos ou psicopatologia na idade adulta (Loscher and Brandt, 2010).

Comparativamente com o hipocampo (onde só houve proteção no pré-tratamento), há uma expressão massiva de subunidades GluN2B nessas regiões durante as primeiras

semanas de vida (Lopez de Armentia and Sah, 2003). Este perfil de neuroproteção particularmente importante da MN pode ser explicado pela sua alta afinidade pelas subunidades GluN2B. Assim, os efeitos neuroprotetores observados em tálamo e amígdala provavelmente podem ser atribuídos a essa expressão aumentada das subunidades GluN2B (Grimwood et al., 1996). Dessa forma, estes resultados apontam para uma possível capacidade da MN de modular eventos tóxicos a partir da atividade diferencial dos NMDARs de acordo com as subunidades expressas. Além disso, a ação multialvo da MN já é um indicativo de que ela pode ser capaz de atuar indiretamente sobre biomarcadores relacionados à hiperestimulação glutamatérgica e que seus efeitos vão além do simples antagonismo que bloqueia o excesso de cálcio intracelular (Parsons et al., 2008; Zaitsev et al., 2015). Nesse contexto, a presença de agonistas de NMDARs leva a um feedback negativo na expressão das subunidades e a MN pode atenuar esse evento (Gascón et al., 2005; Mao et al., 2002). Ademais, já foi reportado que crises convulsivas agudas ou crônicas modulam a expressão das subunidades do NMDAR (Hunt et al., 2012; Jensen et al., 1997). Assim, nós avaliamos o efeito das crises induzidas por PTZ e do tratamento com MN sobre as subunidades do NMDAR.

Nós não observamos alterações na expressão dos genes que codificam as subunidades GluN1 e GluN2B em peixe-zebra submetido às crises com PTZ. Entretanto, esses animais apresentaram um aumento na expressão relativa para o gene *grin2a*, corroborando com Zhu e colaboradores (2004). Eles demonstraram que nos primeiros eventos que ocorrem para o desencadeamento das crises, o gene que codifica GluN2A aumenta expressivamente no córtex. Assim, sugerem que o aumento na expressão de GluN2A contribui para alterações na excitabilidade do SNC, tendo relações com o aumento do tônus excitatório e com o mecanismo de propagação da crise (Mathern et al., 1997; Postnikova et al., 2017). Postnikova e colaboradores (2017) demonstraram que o aumento na expressão de GluN2A é precoce, sendo verificado 3 h após o SE induzido com PTZ, e que mais tardiamente (24h após o SE) a expressão de GluN2B também aumenta. Nós demonstramos que a administração de MN 20 mg/Kg reduziu a expressão da subunidade GluN2A para os níveis do controle. Isto pode ter relação com o potencial efeito da MN em modular a função aberrante do NMDAR demonstrada por Platzer e colaboradores (2017), que investigaram as respostas *in vitro* da MN para controlar o ganho de função tóxica de NMDARs com variantes em GluN2A. Com base nesses achados, a MN foi utilizada *off-label* para tratar um paciente com encefalopatia epiléptica

causada pela função aberrante da subunidade GluN2A (Pierson et al., 2014), sugerindo que a MN é capaz de bloquear a hiperfunção de NMDAR em condições específicas na epilepsia. Assim, nossos dados providenciam evidências para o envolvimento da subunidade GluN2A na regulação da atividade epiléptica das crises induzidas por PTZ e para a capacidade da MN de controlar as alterações do NMDAR durante os processos relacionados à epileptogênese.

Tanto nos modelos animais de epilepsia como nos pacientes, anormalidades comportamentais e prejuízos cognitivos são comumente observados (Choi-Kwon et al., 2003; de Oliveira et al., 2008; Krishnamoorthy et al., 2007; Minjarez et al., 2017). As comorbidades psiquiátricas são mais frequentemente observadas em pacientes com epilepsia do que na população em geral (Tellez-Zenteno et al., 2007). Dessa forma, nós avaliamos o perfil locomotor, exploratório, social e ansioso dos animais submetidos às crises com PTZ. Quando colocado no aparato open tank, o peixe-zebra inicialmente permanece o fundo do tanque, e gradualmente se habitua ao aparato, explorando as porções superiores do tanque com o decorrer do tempo (Maximino et al., 2012; Rosemberg et al., 2011). O teste de preferência social permite acessar parâmetros relacionados à necessidade de interação e também relacionados à ansiedade ou medo (Barba-Escobedo and Gould, 2012). No claro/escuro, o lado branco exerce um estímulo aversivo, e é um aparato classicamente utilizado para acessar parâmetros relacionados ao fenótipo semelhante à ansiedade (Blaser and Gerlai, 2006; Blaser and Peñalosa, 2011; Maximino et al., 2010a; Stephenson et al., 2011). Classicamente, o peixe-zebra aumenta sua permanência na região clara do aparato quando lhe são administrados compostos ansiolíticos, enquanto compostos ansiogênicos diminuem o tempo nessa região (Gebauer et al., 2011; Maximino et al., 2010b; Stewart et al., 2012). Nós não observamos nenhuma alteração no perfil locomotor/exploratório ou no perfil de interação social dos animais expostos ao PTZ. Apesar de existir uma forte relação entre epilepsia e ansiedade (Choi-Kwon et al., 2003; Hingray et al., 2019), nós não observamos nenhum indicativo clássico desse fenótipo nos testes de open tank e sociabilidade. Todavia, nós demonstramos que os animais expostos ao PTZ permanecem mais tempo na região clara do aparato. Nós não acreditamos que isso seja decorrente de um efeito ansiolítico do PTZ. Na verdade, este resultado pode sugerir uma diminuição do comportamento defensivo inato dos animais, fazendo com que eles percam a aversão natural aos ambientes claros. Detour e colaboradores (2005) sugerem que o mau funcionamento das vias encefálicas

relacionadas à expressão do medo causam um prejuízo na avaliação de situações de risco, o que poderia ser confundido com uma diminuição da ansiedade e/ou aumento da impulsividade. Esse fenótipo de “redução da ansiedade” já foi observado no modelo de pilocarpina, nos quais os ratos epiléticos permaneciam mais tempo nos braços abertos do aparato *plus maze* (Detour et al., 2005; dos Santos et al., 2005).

Dessa forma, a ansiedade desempenha um papel crucial na avaliação de exposição ao risco e na defesa inata dos animais, a fim de avaliar a iminência de um perigo (Fanselow, 2018), e prejuízos nesse comportamento defensivo inato podem ser um consequência negativa das crises. Além disso, o comportamento suicida é frequentemente relatado em pacientes que fazem uso de fármacos antiepiléticos (cerca de 15 medicamentos apresentaram aumentos nestes índices em ensaios clínicos). Diversas publicações sugerem que ambos, depressão e suicídio, apresentam taxas expressivas em pacientes com epilepsia. Por esta razão, o FDA recomenda que os fabricantes dessa classe de medicamentos incluam informações nos rótulos sobre o aumento nos riscos de pensamentos suicidas, a fim de alertar médicos e pacientes para um acompanhamento psiquiátrico adequado (e se necessário suspender a medicação) (Andersohn et al., 2010; Mula and Hesdorffer, 2011). O comportamento suicida pode ter relação com a diminuição do comportamento defensivo inato observado em nossos animais, tendo em vista que ambos envolvem a diminuição do senso de autopreservação. Além disso, nós demonstramos que o tratamento com MN foi capaz de prevenir esta anormalidade comportamental. Assim, nossos dados sugerem que a associação da MN com os antiepiléticos clássicos poderia fornecer subsídios para diminuir este tipo de efeito adverso. A literatura reporta inúmeros efeitos benéficos da MN em desordens neuropsiquiátricas (Hosenbocus and Chahal, 2013; Koukopoulos et al., 2012). Além disso, a administração de MN mostrou prevenir alterações no perfil exploratório e na cognição no modelo de Li-pilocarpina (Kalemenev et al., 2016). Esses benefícios também são observados em humanos com epilepsia encefalopática, nos quais o tratamento com MN melhora a qualidade do sono, o humor e outros aspectos gerais da cognição (Platzer et al., 2017). Dessa forma, a MN parece providenciar um bom manejo das consequências comportamentais negativa relacionadas às crises e sua associação com os tratamentos clássicos poderia melhorar o prognóstico dos pacientes epiléticos.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que o tratamento com MN foi capaz de proteger o cérebro contra a morte neuronal induzida por crises epiléticas prolongadas do tipo *Status epilepticus* bem como prevenir as alterações neuroquímicas relacionadas ao dano celular associados às crises epiléticas, demonstrando sua eficácia como uma terapia multialvo. Além disso, a MN parece ser uma estratégia eficaz para a prevenção das alterações comportamentais decorrentes de crises epiléticas. Dessa forma, estudos clínicos futuros que visem a neuroproteção e a redução das comorbidades associadas às epilepsias podem indicar o uso *off-label* da MN como terapia adjuvante (associada aos fármacos clássicos) para o tratamento das consequências neurocomportamentais de crises epiléticas.

8. ANEXO I

Artigo Científico produzido durante o período em que atuei com docente substituta na Universidade Federal de Sergipe (UFS) durante os dois primeiros anos do doutorado.

Título: Coriandrum sativum Extract Prevents Alarm Substance-Induced Fear- and Anxiety-Like Responses in Adult Zebrafish

Revista: Zebrafish

Qualis-CAPES-CBII: B2

Fator de Impacto: 1.75

Atividades exercidas na UFS:

- Professora substituta 40 horas;
- Orientação de TCC do aluno Lucas Santos Souza;
- Implementação de um laboratório para estudos com peixe-zebra e neurociência que culminou neste artigo anexado.

Coriandrum sativum Extract Prevents Alarm Substance-Induced Fear- and Anxiety-Like Responses in Adult Zebrafish

Kamila Cagliari Zenki,^{1,2} Lucas Santos de Souza,² Alisson Mendonça Góis,² Bruno dos Santos Lima,³ Adriano Antunes de Souza Araújo,³ Jodnes Sobreira Vieira,⁴ Enilton Aparecido Camargo,⁵ Eduardo Kalinine,^{1,5} Diogo Losch de Oliveira,¹ and Cristiani Isabel Banderó Walker^{1,2}

Abstract

Anxiety disorders appear to involve distinct neurobiological mechanisms and several medications are available against this mental health problem. However, pharmacological therapeutic approaches display undesirable side effects for patients, particularly when long-term therapy is required. Some evidences have suggested that *Coriandrum sativum* extract (CSE) provide sedative and anxiolytic effects. We investigate if CSE could attenuate anxiety-like behaviors induced by novelty and alarm substance exposures in zebrafish. Adult zebrafish were injected with vehicle, clonazepam, or CSE (25, 50 or 100 mg/kg) and submitted to novel tank test. At the end, saline or alarm substance was added and anxiety-like responses were recorded. Twenty-four hours after, fish were submitted to the light/dark test. Novelty associated with alarm substance exposure decreased distance traveled and total time mobile in novel tank, and CSE (at 50 and 100 mg/kg) prevented these alterations similarly to clonazepam. Alarm substance reduced the time spent in white compartment ($p=0.0193$ as compared with vehicle group). Clonazepam and CSE prevented this anxiogenic effect of alarm substance. CSE presents anxiolytic effects against alarm substance-induced locomotor and anxiogenic responses similarly to clonazepam. These data corroborate with the use of this plant in traditional medicine and provides a putative new pharmacological intervention for anxiety disorders.

Keywords: anxiety, zebrafish, alarm substance, *Coriandrum sativum*

Introduction

ANXIETY DISORDERS ARE among the most prevalent and disabling mental health conditions worldwide.¹ They are considered risk factors for the development of additional mental health disorders and they are associated with an increased risk of suicide in adulthood.² Current pharmacological anxiety treatments include the use of selective serotonin reuptake inhibitors, benzodiazepines, alpha/delta calcium channel blockers, azapirones, and beta blockers.³ Although clinical trials have showed the efficacy of the mentioned drugs, they have displayed a long list of undesirable side

effects for patients, including sedation, muscle relaxation, amnesia, tolerance, and dependence, particularly when long-term therapy was required.⁴ These unwanted adverse effects have propelled scientists to search new chemical entities, mainly those from traditional medicine.⁵

In this context, several plants from different parts of the world, such as *Passiflora coerulea*, *Matricaria recutita*, *Valeriana officinalis*, *Salvia guaranitica*, *Tilia europaeae*, and *Tilia tormentosa*, have been employed to discover new chemicals with putative sedative or anxiolytic effects.^{6,7}

Another plant with reported anxiolytic and sedative effects in folk medicine is *Coriandrum sativum* (Apiaceae).

¹Laboratory of Cellular Neurochemistry, Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Laboratory of Neuropharmacological Studies in Zebrafish, Department of Pharmacy, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brazil.

³Laboratory of Pharmaceutical Trials and Toxicity, Department of Pharmacy, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brazil.

⁴Laboratory of Nutrition of Aquatic Organisms, Department of Zootechny, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brazil.

⁵Laboratory of Pharmacology of Natural Products and Inflammation, Department of Physiology, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brazil.

Popularly known as “coentro” in Brazil and coriander in other places, *C. sativum* has been used as a culinary and medicinal plant over the years.^{8,9} Their leaves and seeds are widely used by folk medicine for treatment of digestive disorders, appetite loss, diabetes, and other diseases.^{8,10} Regarding its biological activity, this plant has hypoglycemic, anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects.^{8,11,12}

Moreover, other additional effects, such as hypolipidemic, antimutagenic, antihypertensive, diuretic, carminative, antispasmodic, and relaxant, were observed.^{13–20} In Iranian traditional medicine, the coriander aerial parts have been used for relief of anxiety and insomnia because of its sedative and hypnotic effects.^{16,21,22} The traditional dose of seed powder is from 1 to 5 g, three times per day. This translates to a 14–71 mg/kg dose, three times per day.^{21,23} Importantly, coriander decoction to compose polyherbal traditional remedies from Ksar Lakbir district (NW Morocco) are used as neurosedative and to calm.²⁴

On the brain, *C. sativum* extracts (CSEs) have been reported to exhibit sedative and anxiolytic effects. Mahendra and Bisht⁹ showed that hydroalcoholic extract of coriander (100 and 200 mg/kg) produced anxiolytic effects similar to diazepam in different animal models of anxiety in mice. In addition, Emamghoreishi *et al.*¹⁶ and Latha *et al.*²⁵ demonstrated that aqueous extract of coriander (100 and 200 mg/kg, respectively) induced an anxiolytic activity in mice by increasing both the time spent and the percentage of entries in the open arms of elevated plus maze.

Considering the traditional use of *C. sativum* and its sedative effects reported in rodents, as also the possibility of having high amount of quercetin in coriander extracts, it has been hypothesized that CSE might also possess anxiolytic properties. Thus, the present study aimed to investigate the putative antianxiety and antistress actions of *C. sativum* hydroalcoholic leaf extract in zebrafish. For inducing anxiety and stress responses we exposed zebrafish to two distinct paradigms: novel tank test and alarm substance exposure. Novel tank test is widely used as a tool to induce anxiety responses associated to a novel environment exposure.^{26,27}

Materials and Methods

Plant collection

C. sativum L. was collected in Aquidabã (10° 16' 53" S 37° 01' 07" W), Sergipe, Brazil, between June and August. A voucher specimen number ASE 35.092 was deposited at Herbarium of the Department of Botany, Federal University of Sergipe (UFS), Brazil.

Extract preparation

C. sativum fresh leaves (282 g) were macerated with 2 L of ethanol (70%) at room temperature. Crude hydroalcoholic extract was concentrated up to dryness in a rotary evaporator (Fisatom[®], model 802, Brazil) at 40°C. The product formed was frozen at –20°C for 24 h and lyophilized (Labconco[®], FreeZone 4.5 model). Total yield was 3.898%.

High-performance liquid chromatography analysis

Chromatographic analysis was performed using a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Columbia, MD) composed of two pumps with an online degasser, an autoinjector, and a

C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm) coupled to a DAD-UV/Vis detector. Sample volume of 20 μL (1 mg/mL) was dissolved in HPLC grade methanol and subjected to gradient elution with mobile phases consisting of water and methanol from 5% to 100% during 60 min in a wavelength range from 220 to 400 nm. Shimadzu LC Solution software (Kyoto, Japan) was used for data acquisition. Identification of the compounds was performed with the coinjection of standard secondary metabolites, according with their retention time (RT) and UV spectra. Gallic acid (C₇H₆O₅), caffeic acid (C₉H₈O₄), luteolin (C₁₅H₁₀O₆), quercetin 3-β-D-glucoside (C₂₁H₂₀O₁₂), and rutin (C₂₇H₃₀O₁₆), were obtained from Sigma-Aldrich[®] and diluted with methanol (see chromatogram in Fig. 1). To calculate the concentration of each secondary metabolite, calibration curves for each compound were performed with five different concentrations ranging from 1 to 50 μg/mL. Analyses were performed in triplicate (n = 3).

Animals and treatments

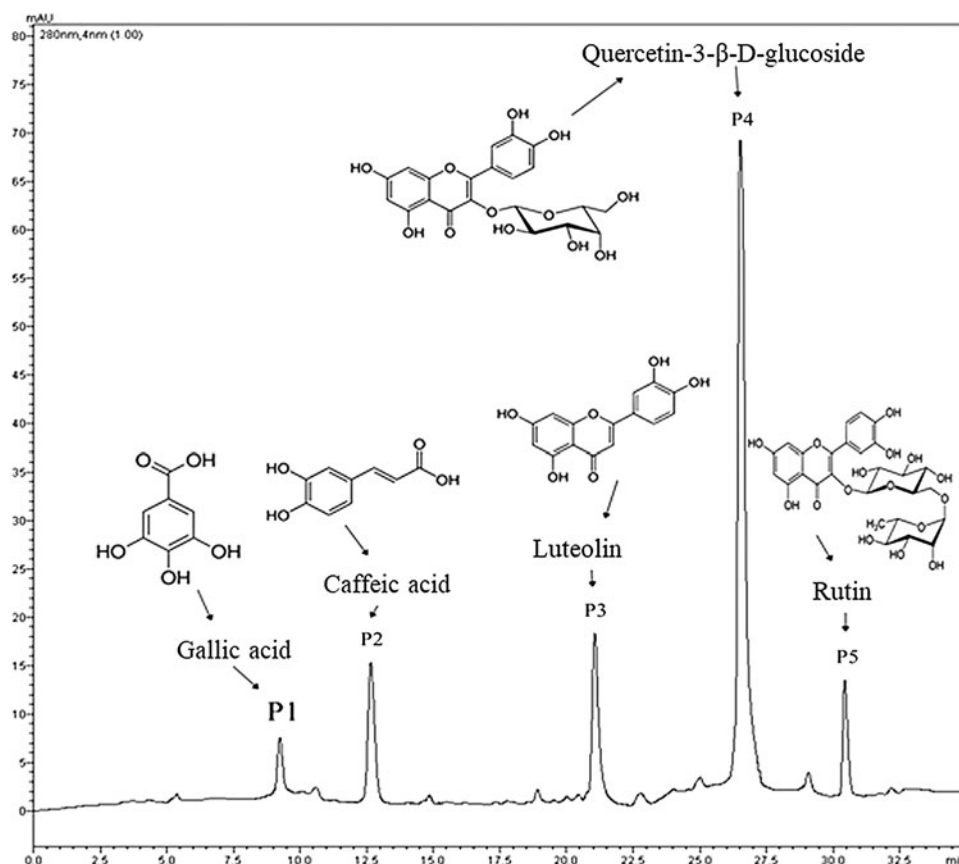
A total of 105 male adult zebrafish (*Danio rerio*) (short fin wild-type strain; 4–6 months old) were used in the present work. They were obtained from a local commercial supplier (Aquazoo, SE, Brazil) and were acclimated for at least 2 weeks prior the experiments. Animals were maintained in “home tanks,” which consisted in 20 L aerated tanks (three animals/L) filled with distilled water under mechanical and chemical filtration. Water temperature, pH, and conductivity were adjusted to 26°C ± 2°C, 7.0–8.0, and 500 μS, respectively.

Ceiling-mounted fluorescent white lamps provided room illumination (600 lux). Light/dark cycle was 12/12 h (lights on at 7:00 am). Only animals weighing between 0.25 and 0.35 g were used. All animals were fed four times a day with ALCON BASIC[™] flake food (ALCON, Brazil; twice a day) and *Artemia sp.* nauplii (twice a day). All procedures were performed according to the Brazilian's Law for Care and Use of Laboratory Animals (Law 11794/2008) and previously approved by the Animal Research Ethics Committee from UFS/Brazil (protocol number 37/2015).

Alarm substance extraction. Alarm substance was extracted as described previously.^{28–30} One set of zebrafish (five animals that were not used for behavioral analysis) were cold anesthetized and quickly euthanized by decapitation. Alarm substance was extracted performing fifteen superficial cuts in the skin of animals and then washed with saline solution (10 mL/animal). During the extraction and further use, alarm substance solution was kept on ice, at 4°C.

Drug administration. Another set of animals (n = 100 animals) were anesthetized by tricaine immersion (160 μg/mL)³¹ and further injected i.p. with CSE (25, 50 or 100 mg/kg), or clonazepam (0.05 mg/kg) or vehicle (20 animals/group). The maximal volume of injection was 10 μL/g of body mass.³² Immersion in tricaine lasted 1–2 min, until fish were completely immobile and decreased opercular opening. Vehicle was composed of 40% propylene glycol, 10% ethyl alcohol, 5% sodium benzoate, and 1.5% benzyl alcohol.^{33,34} Drugs were administered 30 min before the behavioral evaluations.⁹

FIG. 1. Chromatogram of a fresh leaf aqueous alcoholic extract (70% ethanol) from *Coriandrum sativum* after lyophilization.



Behavioral procedures and alarm substance exposure

All behavioral tests were performed between 9:00 a.m. and 4:00 p.m. Behavioral analysis was conducted as depicted in Figure 2. Animals treated with vehicle, clonazepam, or CSE were submitted to novel tank test for 6 min. At the end of the novel tank test, animals were exposed to alarm substance. Without removing animals from the novel tank apparatus, alarm substance (3.5 mL of skin washout/L) or saline solution were carefully delivered in the tank through a syringe connected to a polypropylene tube ($n = 10$ animals for each group).

Swimming behavior was recorded for additional 6 min. After this period, fish were removed from the novel tank apparatus and placed, in pairs, in 1.5-L tanks until the beginning of the light/dark test. This strategy was used for keeping all experimental groups for the same time period of 24 h until the beginning of light/dark test. All behavioral tests were conducted under white illumination (800 lux of intensity). Behavioral analysis was performed in four independent experiments (25 animals/experiment). Animals were randomly distributed in each experiment as well as in experimental group by using an online tool for randomization (www.randomizer.org).

Novel tank test. Novel tank consisted of a 1.5-L trapezoidal tank (23.9 cm along the bottom \times 28.9 cm at the top \times 15.1 cm high \times 15.9 cm along the diagonal side) similar to those previously described by Rosemberg *et al.*³⁵ Tank was filled with 1.5 L home-tank water and was divided in three equally virtual horizontal areas (named bottom, middle, and top). The following behavioral variables were evaluated:

total time mobile (s), distance travelled (m), total time spent (s) in bottom, middle, and top areas. A video camera located ~ 40 cm ahead the tank was used to monitor the activity of fish. ANY-Maze[®] software was used to track the swimming pattern of fish. Imobility was previously defined as the absence of movement or fish moving slower than 1 cm/s.

Light/dark test. The light/dark test was performed accordingly to Maximino *et al.*³³ with modifications. Apparatus consisted of a tank (15 \times 10 \times 45 cm, height \times depth \times length) equally divided into two distinct compartments (one black and other white covered). Opaque plastic self-adhesive films were used for covering walls and floor of both compartments. Apparatus was filled with 1.5 L home-tank water. Animals were individually placed in the lit area of the tank and were allowed to explore the apparatus for 15 min. The following behavioral parameters were recorded: number of entries and time spent in each compartment, and number of risk assessment behaviors. Risk assessment behaviors were defined as a partial entry in the white compartment followed by a fast return to the dark one.³⁶

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. All data were first tested for normality by D'Agostino–Pearson omnibus normality test. Basal novel tank data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Behavioral data from light/dark test and alarm substance exposure were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's *post hoc* test. For each data, Cohen's *d* was shown as

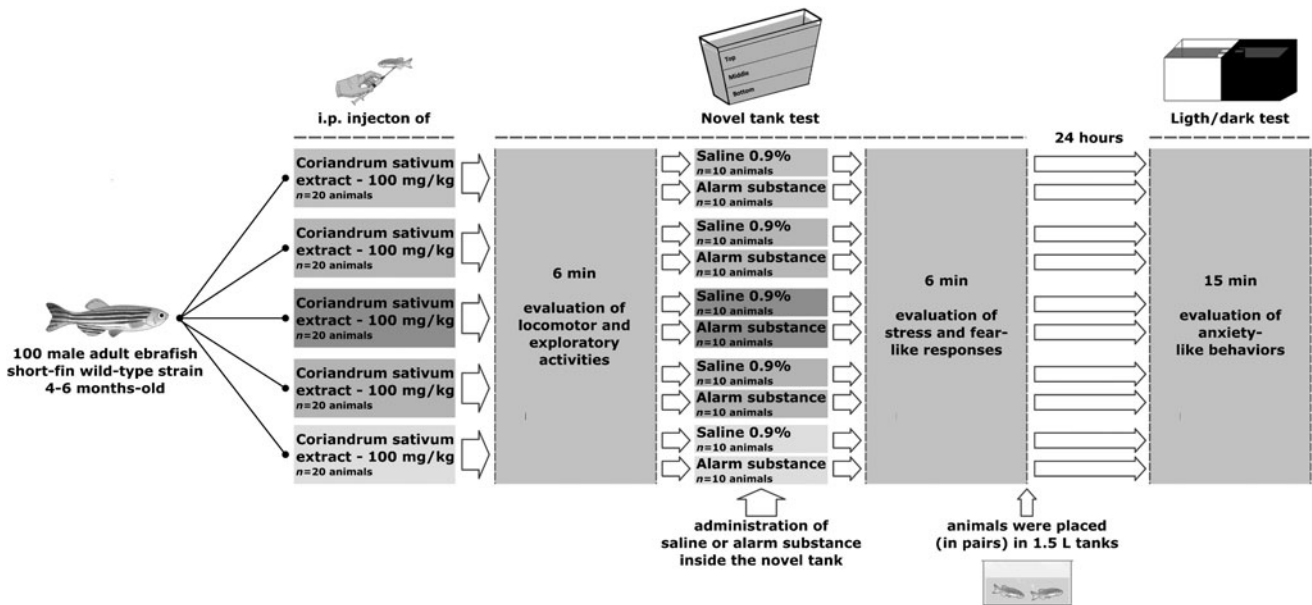


FIG. 2. Diagram illustrating the experimental design. After acquisition, animals were acclimated for 2 weeks before the beginning of the experiments. Animals were injected with vehicle, clonazepam, or CSE and were submitted to novel tank test for evaluating the basal locomotor and exploratory activities. At the end of novel tank test, saline or alarm substance were added to the tank and the locomotor and anxiety-like responses were recorded during 6 min. After this period, animals returned in pairs to the home-tank. Twenty-four hours after, fish were submitted to the light/dark test. CSE, *Coriandrum sativum* extract.

Cumming estimation plot. The raw data were plotted on the upper axes of figures; each mean difference was plotted on the lower axes of figures as a bootstrap sampling distribution. Mean differences are depicted as dots; 95% confidence intervals are indicated by the ends of the vertical error bars. $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

HPLC characterization of CSE

Chromatographic profile of the CSE was shown in Figure 1. Fractions P1 (RT: 9.16 min), P2 (RT: 12.58 min), P3 (RT: 21.09 min), P4 (RT: 26.49 min), and P5 (RT: 30.37 min), were

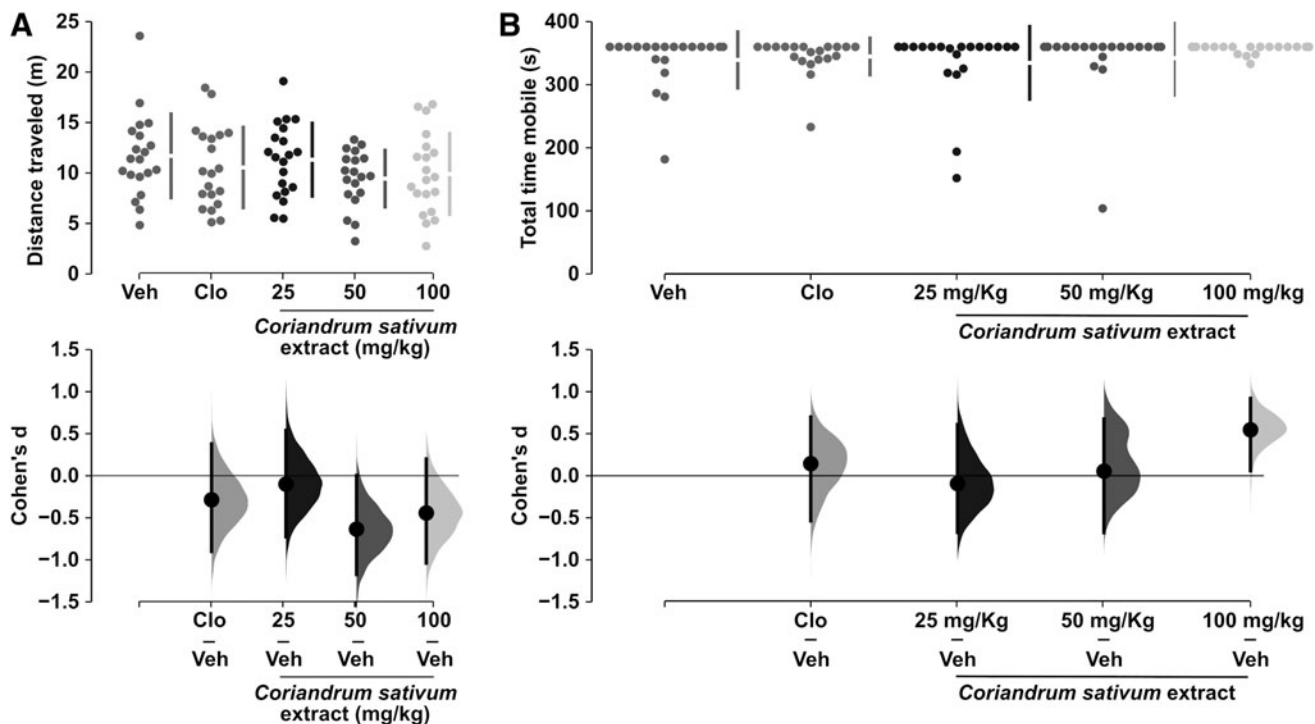


FIG. 3. Baseline locomotor profile of fish treated with vehicle, clonazepam or CSE; $n = 20$ animals/group. (A) Total distance travelled (m) in apparatus during 6 min of trial; (B) Total mobile time (s) during 6 min. Data expressed as mean \pm standard deviation (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

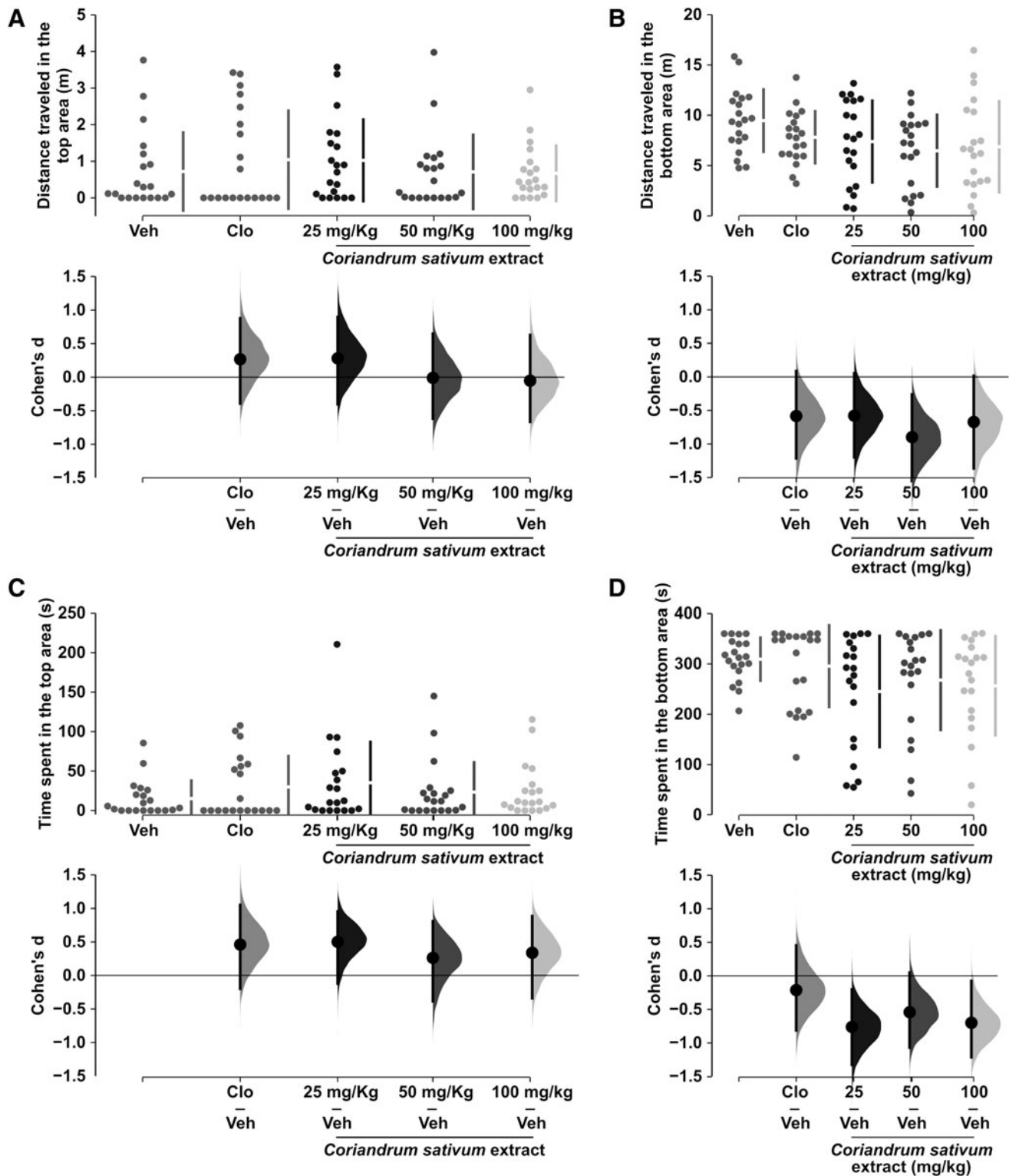


FIG. 4. Baseline exploratory profiles into two horizontal portions of the apparatus: (A) Total distance travelled in top area (m); (B) Total distance travelled in bottom area (m); (C) Total time spent in top area (s); (D) Total time spent in bottom area (s) of fish treated with vehicle, clonazepam, or CSE. $n=20$ animals/group. Data expressed as mean \pm standard deviation (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

identified as gallic acid, caffeic acid, luteolin, quercetin 3- β -D-glucoside, and rutin, respectively. Quantitative analysis was obtained by using calibration curves of each secondary metabolite. All curves showed a correlation coefficient of $r \geq 0.999$. Concentrations of P1, P2, P3, P4, and P5 were 1.88, 2.32, 5.61, 43.56, and 3.21 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Effect of CSE on alarm substance-induced alterations in locomotor and exploratory activities

Baseline locomotor and exploratory activities did not differ among experimental groups (Figs. 3–5). Animals spent more time in the bottom area. Clonazepam or CSE administration did not alter distance traveled or time spent in homebase area when compared with control group, suggesting a classical homebase formation (Fig. 5). In control groups, alarm substance exposure reduced distance traveled and total time mobile (Fig. 6A $F[1,90]=7.638$ and B $F[1,90]=3.997$; $p=0.0257$ and 0.0343 , respectively). To distance parameter, the unpaired Cohen's d between vehicle-saline and vehicle-alarm is -1.27 [95.0% CI $-2.55, -0.242$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.0257 ; the unpaired Cohen's d between clonazepam-saline and clonazepam-alarm is -0.512 [95.0% CI $-1.45, 0.454$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.273 ; the unpaired Cohen's d between 25 mg/kg-saline and 25 mg/kg-alarm is -1.5 [95.0% CI $-2.6, -0.368$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.00911 ; the unpaired Cohen's d between 50 mg/kg-saline and 50 mg/kg-alarm is 0.0705 [95.0% CI $-0.864, 1.0$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is

0.734 ; the unpaired Cohen's d between 100 mg/kg-saline and 100 mg/kg-alarm is 0.0891 [95.0% CI $-0.862, 1.0$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.734 .

Only treatment with 25 mg/kg of CSE ($p=0.0322$) did not prevent the alarm substance-induced behavioral changes. In contrast, 50 and 100 mg/kg of CSE prevented the reduction in distance travelled and total time mobile induced by alarm substance (Fig. 6A, B, respectively). There was no difference between groups regarding distance traveled and time spent in top and bottom areas (Fig. 7). Although distance traveled in top area was not different among groups, alarm substance exposure appears to reduce suddenly the distance traveled in vehicle group ($p=0.2621$) (Fig. 7A).

Effect of CSE on anxiety-like behaviors

Alarm substance exposure reduced the time spent in white compartment when compared with fish from saline group ($p=0.0193$). Treatment with clonazepam and CSE in all tested concentrations prevented this reduction (Fig. 8A; $F[1,90]=5.514$). The unpaired Cohen's d between vehicle-saline and vehicle-alarm is -1.35 [95.0% CI $-2.53, -0.2$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.0173 ; the unpaired Cohen's d between clonazepam-saline and clonazepam-alarm is 0.704 [95.0% CI $-0.236, 1.78$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.186 ; the unpaired Cohen's d between 25 mg/kg-saline and 25 mg/kg-alarm is -2.06 [95.0% CI $-2.98, -1.03$]. The two-sided p value of the Mann-Whitney test is 0.00131 ; the unpaired

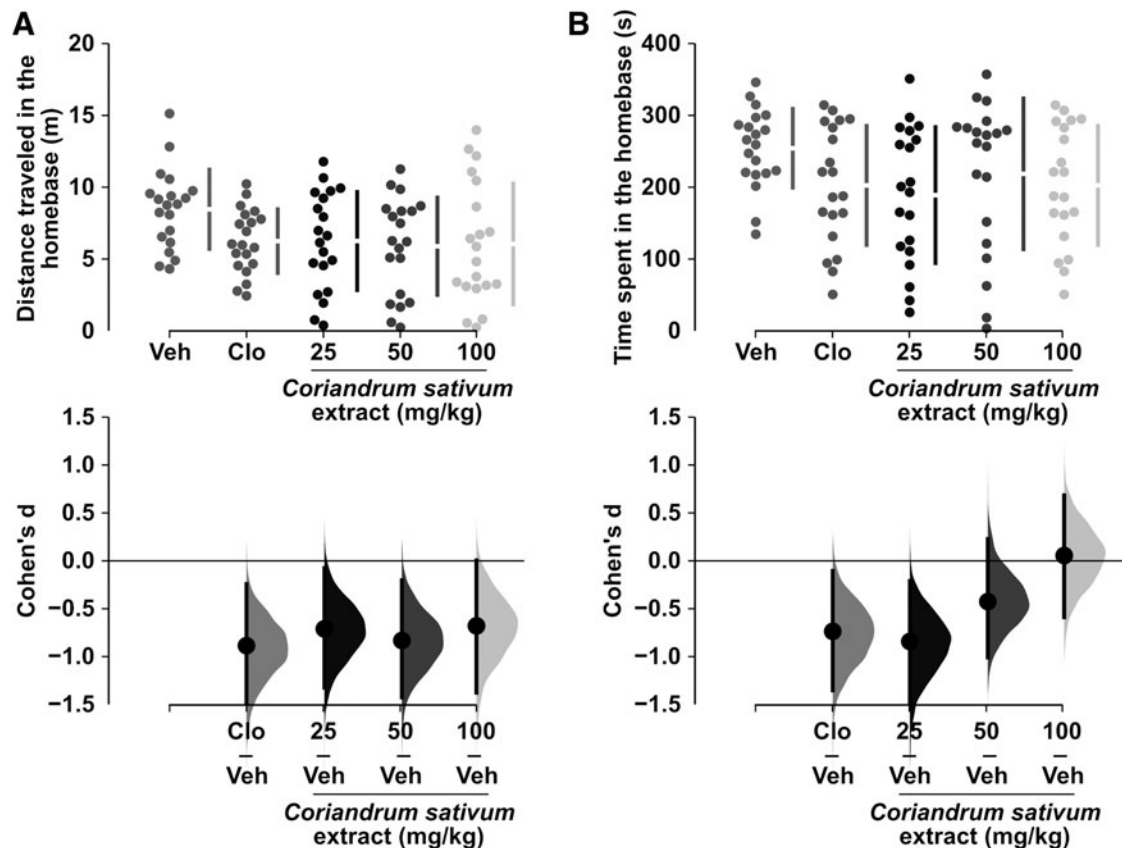


FIG. 5. Locomotor profiles in homebase area of fish treated with vehicle, clonazepam or CSE. (A) Total distance traveled and (B) total time spent in the home base area. $n=20$ animals/group. Data expressed as mean \pm standard deviation (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test). Data expressed as mean \pm standard deviation.

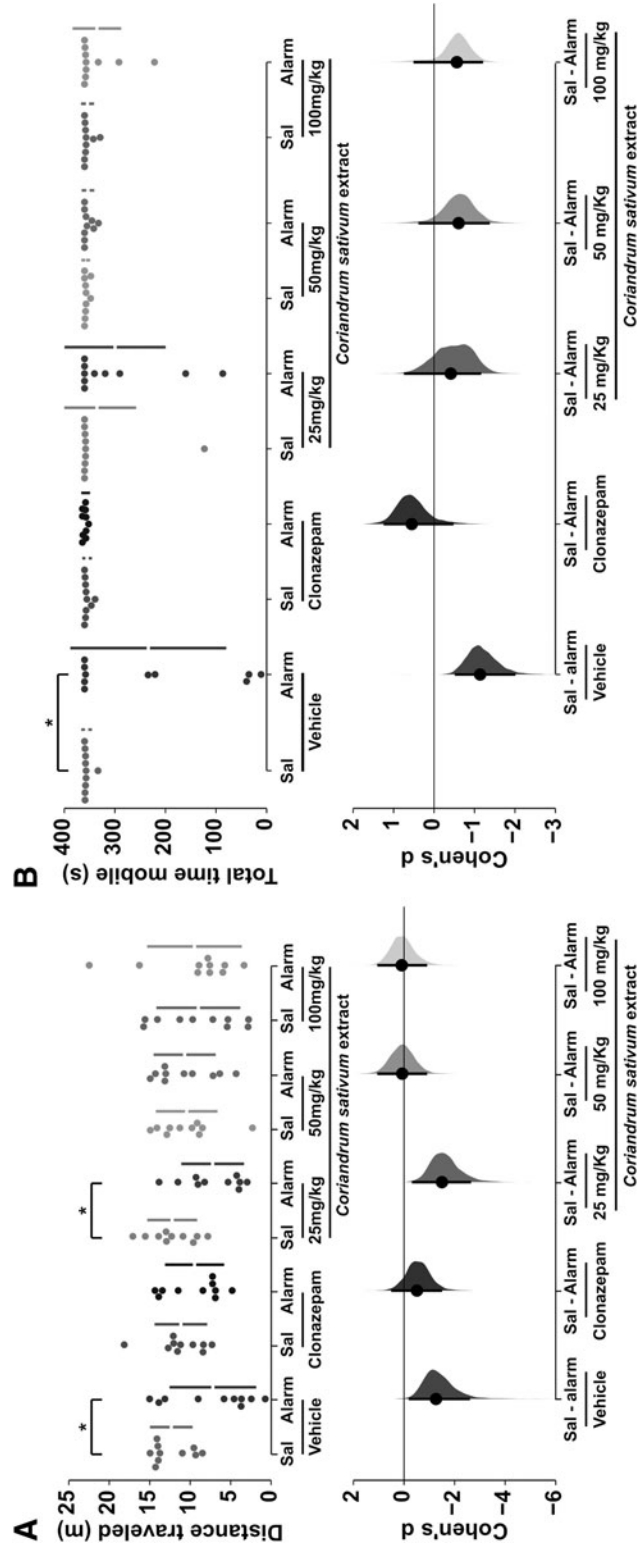


FIG. 6. Locomotor and exploratory profiles of vehicle, clonazepam-, or CSE-treated groups after alarm substance exposure. $n = 10$ animals/group. (A) Total distance traveled and (B) total time mobile in the apparatus. $*p \leq 0.05$ differs significantly when compared with the respective control group (two-way ANOVA followed by Sidak's *post hoc* test). Data were expressed as mean \pm standard deviation.

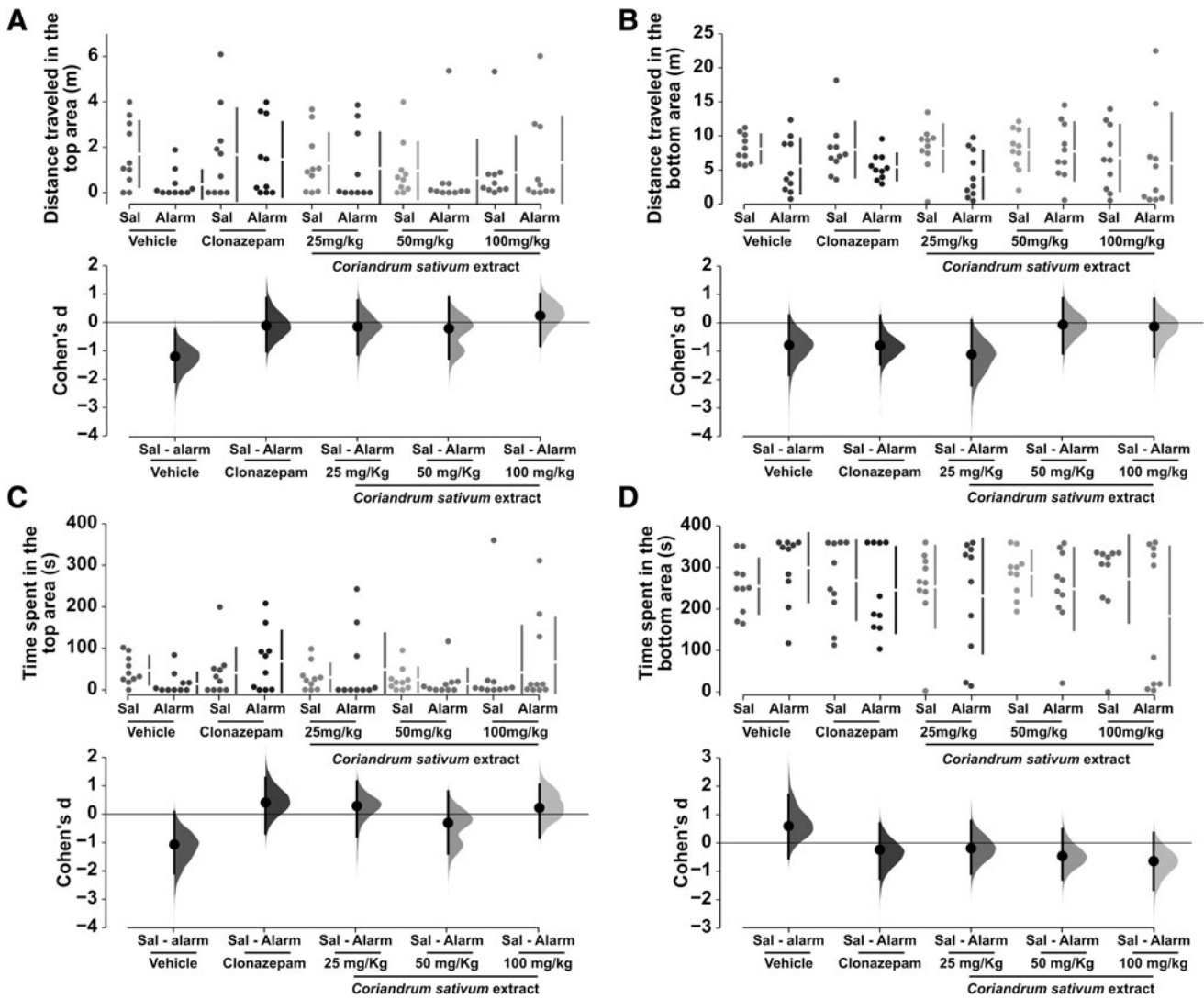


FIG. 7. Locomotor and exploratory profiles of vehicle, clonazepam-, or CSE-treated groups after alarm substance exposure. $n=10$ animals per group. (A) Total distance traveled in the top area; (B) total distance traveled in the top bottom; (C) total time spent in the top area; and (D) total time spent in the top area of the apparatus. Data are expressed as mean \pm standard deviation and were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's *post hoc* test.

Cohen's *d* between 50 mg/kg-saline and 50 mg/kg-alarm is -0.253 [95.0% CI $-1.22, 0.736$]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.623; the unpaired Cohen's *d* between 100 mg/kg-saline and 100 mg/kg-alarm is -0.498 [95.0% CI $-1.39, 0.489$]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.345.

Moreover, alarm substance induced a significant increase in the risk assessment behaviors in animals treated with vehicle ($p < 0.0001$) and clonazepam ($p = 0.0173$). There was no difference in risk assessment behaviors in CSE-treated animals (Fig. 8C; $F[1,90] = 5.514$). The unpaired Cohen's *d* between vehicle-saline and vehicle-alarm is 6.6 [95.0% CI 4.81, 8.81]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.000176; the unpaired Cohen's *d* between clonazepam-saline and clonazepam-alarm is 1.43 [95.0% CI 0.667, 2.31]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.009; the unpaired Cohen's *d* between 25 mg/kg-saline and 25 mg/kg-alarm is 0.688 [95.0% CI $-0.293, 1.72$]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.0818; the unpaired Cohen's *d* between 50 mg/kg-saline and 50 mg/kg-alarm is 0.751 [95.0% CI

$-0.211, 1.46$]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.172; The unpaired Cohen's *d* between 100 mg/kg-saline and 100 mg/kg-alarm is 0.944 [95.0% CI $-0.158, 1.85$]. The two-sided *p* value of the Mann-Whitney test is 0.0885. The number of crossing was not altered in any groups (Fig. 8B).

Discussion

To evaluate the locomotor and exploratory activities in fish treated with CSE, we tested it at concentrations ranging from 25 to 100 mg/kg. After treatments, animals performed novel tank test before (baseline) and after (post stress) saline or alarm substance exposure. We observed that CSE-treated animals did not present alterations in baseline behavior. In the present study motor and nonmotor patterns associated with anxiety-like behaviors after stressful paradigm were analyzed, to investigate the putative CSE anxiolytic effect. In poststress session, total distance traveled and total time mobile decreases after alarm substance administration when compared with saline administration in vehicle-treated animals,

whereas treatment with clonazepam and CSE (50 and 100 mg/kg) did not alter this parameter. We also found that acute exposure to alarm substance inhibited transitions to the top of the tank. These data corroborate with previous findings in which alarm substance exposure disrupts rapid habituation response of zebrafish in the novel tank test³⁷ and suggest that alarm substance is effective in inducing fear responses in zebrafish.²⁸ Thus, CSE-treated animals presented an anxiolytic response similar to clonazepam-treated animals into stressful paradigm used in the present study.

Situations like threat or danger cause fear and/or anxiety that may elicit innate defensive behaviors. Pharmacological studies show that alarm substance released from injured skin cells may elicit defensive behaviors characterized by increased speed of movement, erratic movements, freezing bouts, and agglomeration in the bottom zone of the tank.^{27,28,30,38,39} Therefore, decrease in movement observed in the poststress session in novel tank may be related to alarm substance exposure added to new environment interaction, considering that first novel tank session provides a stressor stimulus.

In fact, besides alarm substance exposure, we explore the novel tank test to propitiate stressful condition, because it is known as a novel tank that is being utilized as a tool to reveal the animal's interaction with a novel environment.^{26,27} Several studies justified this test as a model of anxiety based on the animal's natural instinct to seek protection in an unfamiliar environment presented exploration, freezing, or immobility and top entries,^{26,29,40} and it is a behavioral tool that is used to measure novelty-associated behavioral stress responses.⁴¹

To confirm the anxiolytic action of CSE demonstrated in novel tank test, we evaluated the light/dark test. It has been used as an anxiety test and anxiolytic drugs have been found to increase the time spent in the light zone, whereas anxiogenic drugs decreased it.^{33,34,42} We demonstrated for the first time that novel tank associated with alarm substance administration produces an anxiogenic effect that persists during 24 h. Importantly, CSE and clonazepam administration provide a control of this long-term behavior alteration. Our results demonstrated that CSE prevents anxiety-like phenotype produced by novelty response associated to alarm substance exposure, as well as exploratory and locomotor influences produced by acute alarm substance administration.

C. sativum, popularly known as “coentro” or coriander, is traditionally used for gastrointestinal and cardiovascular disorders.⁴³ Additionally, some evidence supports this plant use in convulsions, anxiety, insomnia, because of its sedative property.^{16,17,44} Also, in the Indian traditional medicine, it is used in the disorders of digestive, respiratory, and urinary systems, as it has diaphoretic and diuretic effects.⁹

Several compounds have been isolated from coriander oil, such linalool, α -pirene, γ -terpinene, geranyl acetate, camphor,

and geraniol,^{14,15} although many biologically active compounds are also soluble in water.⁴⁵ CSE was characterized for LC-MS screening, which revealed the presence of a high amount of quercetin. There are several studies, which have shown that quercetin produces a variety of anxiolytic-like behavioral effects.^{46–48} Nevertheless, it has been reported that

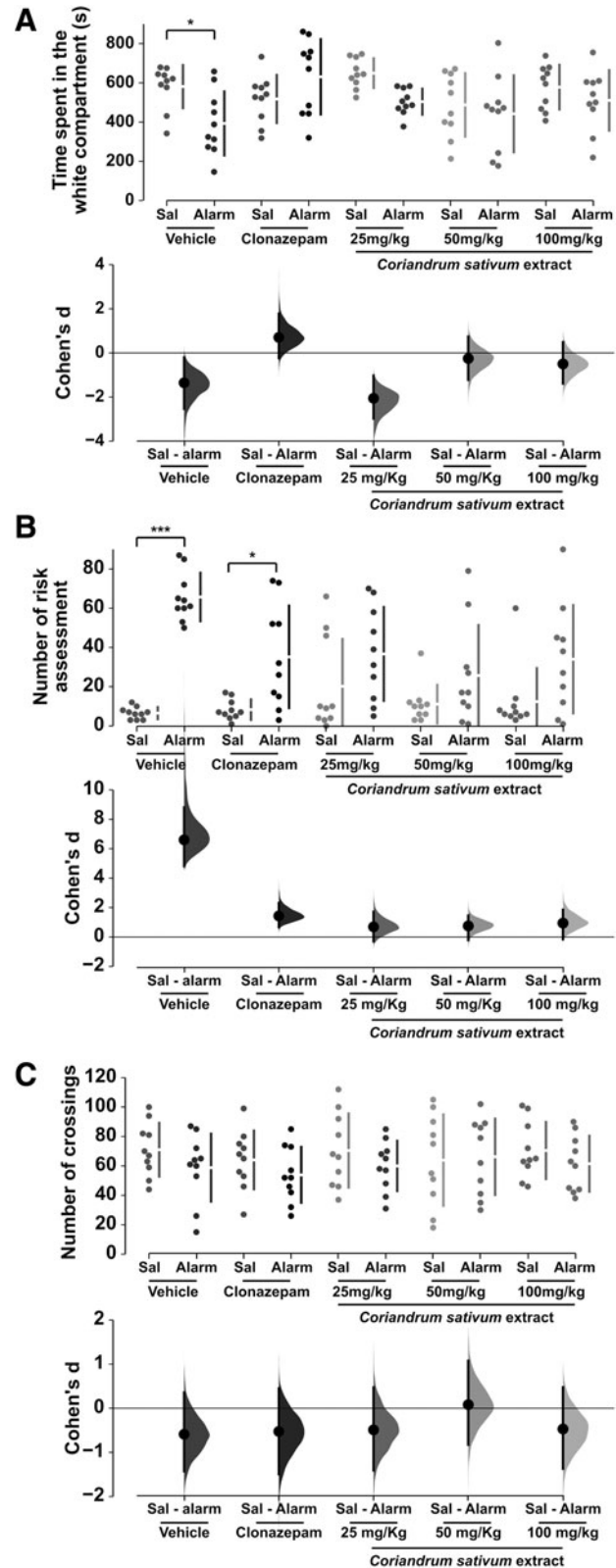


FIG. 8. Anxiety-like behavioral profile of vehicle, clonazepam, or CSE-treated groups after alarm substance exposure. (A) Total time spent in the white compartment of black/white apparatus; (B) number of risk assessment behaviors; and (C) number of crossings between white and black compartment. $n = 10$ animals per group. $*p \leq 0.05$ and $***p \leq 0.0001$ differs significantly when compared with respective to control group (two-way ANOVA followed by Sidak's *post hoc* test).

quercetin present good potential to reduce stress, decreased plasma cortisol levels, and improve memory performance.^{49,50} Moreover, quercetin could prevent the impairment of the enzymes that regulate the purinergic and cholinergic extracellular signaling as adenosine deaminase and acetylcholinesterase improving the memory and anxiety-like behavior induced by streptozotocin-induced diabetic rats.⁵¹ Taken together, these results may suggest that quercetin might be responsible for improving behavioral dysfunction during anxiety episodes. Although quercetin is the major compound in CSE, its anxiolytic effect is probably related to polyphenol mixture, considering the potential of these compounds for modulation of the anxiety-like phenotype.^{52,53}

In the present work, treatment with clonazepam prevented the alarm substance-induced decrease in time spent in white compartment. Another study demonstrated a similar result for clonazepam (0.3 mg/L) in light/dark test.⁴² Studies verified that treatment with anxiolytic drugs as fluoxetine, clonazepam, buspirone, and ethanol reduced fear- and anxiety-like behavior.^{34,40,42} Doses of CSE administered in this work did not alter the number of crossing responses in the light/dark test, suggesting a potential anxiolytic effect without producing effects on locomotion. Indeed, vehicle- and clonazepam-treated animals increased the number of risk assessment episodes, whereas CSE prevent this effect in the light/dark test. This parameter indicates a potential anxiolytic activity to CSE. Due to this, CSE represents a new potential candidate for treatment of anxiety disorders without producing effects on locomotion.

Conclusion

Our findings suggest that long-term anxiety behavior may be achieved using a combination of novelty response in novel tank and alarm substance exposure in zebrafish. In this approach, CSE promoted anxiolytic effect. Thus, this work assists in the efficacy confirmation of this plant used in traditional medicine and can provide a new pharmacological intervention in anxiety disorders.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), FAPERGS/PRONEX edital no. 16/2551-0000499-4, CNPq – Edital Doenças Neurodegenerativas no. 467676/2014-3.

References

1. Spinhoven P, Batelaan N, Rhebergen D, van Balkom A, Schoevers R, Penninx BW. Prediction of 6-yr symptom course trajectories of anxiety disorders by diagnostic, clinical and psychological variables. *J Anxiety Disord* 2016;44:92–101.
2. Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:545–552.
3. Farach FJ, Pruitt LD, Jun JJ, Jerud AB, Zoellner LA, Roy-Byrne PP. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. *J Anxiety Disord* 2012;26:833–843.
4. Huh J, Goebert D, Takeshita J, Lu BY, Kang M. Treatment of generalized anxiety disorder: a comprehensive review of the literature for psychopharmacologic alternatives to newer antidepressants and benzodiazepines. *Prim Care Companion CNS Disord* 2011;13.
5. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Rahimi R, Abbasabadi F, Abdollahi M. A systematic review of plant-derived natural compounds for anxiety disorders. *Curr Top Med Chem* 2016;16:1924–1942.
6. McIntyre E, Saliba AJ, Wiener KK, Sarris J. Herbal medicine use behaviour in Australian adults who experience anxiety: a descriptive study. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:60.
7. Gomes NG, Campos MG, Orfao JM, Ribeiro CA. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:1372–1389.
8. Laribi B, Kouki K, M'Hamdi M, Bettaieb T. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia* 2015;103:9–26.
9. Mahendra P, Bisht S. Anti-anxiety activity of *Coriandrum sativum* assessed using different experimental anxiety models. *Indian J Pharmacol* 2011;43:574–577.
10. Helm J, Hanelt P. [The “Herb Book” by Johannes Kentmann of 1563]. *Sudhoffs Arch* 1971;13:Suppl 13:89–21.
11. Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S. Coriander (*Coriandrum sativum*): a promising functional food toward the well-being. *Food Res Int* 2018;105:305–323.
12. Pellegrini M, Ricci A, Serio A, Chaves-Lopez C, Mazzarrino G, D'Amato S, et al. Characterization of essential oils obtained from abruzzo autochthonous plants: antioxidant and antimicrobial activities assessment for food application. *Foods* 2018;7.
13. Anaeigoudari A, Hosseini M, Karami R, Vafaei F, Mohammadpour T, Ghorbani A, et al. The effects of different fractions of *Coriandrum sativum* on pentylenetetrazole-induced seizures and brain tissues oxidative damage in rats. *Avicenna J Phytomed* 2016;6:223–235.
14. Caputo L, Souza LF, Alloisio S, Cornara L, De Feo V. *Coriandrum sativum* and *Lavandula angustifolia* essential oils: chemical composition and activity on central nervous system. *Int J Mol Sci* 2016;17.
15. Cioanca O, Hritcu L, Mihasan M, Trifan A, Hancianu M. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2014;131:68–74.
16. Emamghoreishi M, Khasaki M, Aazam MF. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *J Ethnopharmacol* 2005;96:365–370.
17. Gaston MS, Cid MP, Vazquez AM, Decarlino MF, Demmel GI, Rossi LI, et al. Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. *Pharm Biol* 2016;54:1954–1961.
18. Hajhashemi V, Safaei A. Hypnotic effect of *Coriandrum sativum*, *Ziziphus jujuba*, *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* extracts in mice. *Res Pharm Sci* 2015;10:477–484.
19. Karami R, Hosseini M, Mohammadpour T, Ghorbani A, Sadeghnia HR, Rakhshandeh H, et al. Effects of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* on oxidative damage in pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Iran J Neurol* 2015;14:59–66.
20. Liu QF, Jeong H, Lee JH, Hong YK, Oh Y, Kim YM, et al. *Coriandrum sativum* suppresses $\alpha\beta$ 42-induced ROS increases, glial cell proliferation, and ERK activation. *Am J Chin Med* 2016;44:1325–1347.
21. Zargari A. *Medicinal Plants*, p. 136. Tehran University Publishing, Tehran, 1997.

22. Andalib S, Vaseghi A, Vaseghi G, Naeini AM. Sedative and hypnotic effects of Iranian traditional medicinal herbs used for treatment of insomnia. *EXCLI J* 2011;10:192–197.
23. Rabbani MVG, Sajjadi SE. Persian herbal medicines with anxiolytic properties. *J Med Plants* 2011;39:7–11.
24. Merzouki A, Ed-derfoufi F, Molerio Mesa J. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *Fitoterapia* 2000;71:278–307.
25. Latha K, Rammohan B, Sunanda BP, Maheswari MS, Mohan SK. Evaluation of anxiolytic activity of aqueous extract of *Coriandrum sativum* Linn. in mice: a preliminary experimental study. *Pharmacognosy Res* 2015;7:S47–S51.
26. Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc* 2010;5:1786–1799.
27. Canzian J, Fontana BD, Quadros VA, Rosemberg DB. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav Brain Res* 2017;320:255–263.
28. Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2008;188:168–177.
29. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 2009;205:38–44.
30. Quadros VA, Silveira A, Giuliani GS, Didonet F, Silveira AS, Nunes ME, *et al.* Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav Processes* 2016;122:1–11.
31. Alfaro JM, Ripoll-Gomez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci* 2011;33:1252–1255.
32. Kinkel MD, Eames SC, Philipson LH, Prince VE. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp* 2010.
33. Maximino C, Marques de Brito T, Dias CA, Gouveia A, Jr., Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc* 2010;5:209–216.
34. Maximino C, da Silva AW, Gouveia A, Jr., Herculano AM. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:624–631.
35. Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, *et al.* Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One* 2011;6:e19397.
36. Nunes ME, Muller TE, Braga MM, Fontana BD, Quadros VA, Marins A, *et al.* Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. *Mol Neurobiol* 2016.
37. Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, *et al.* Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2010;208:450–457.
38. Jesuthasan SJ, Mathuru AS. The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *J Neurogenet* 2008;22:211–228.
39. Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, *et al.* Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 2013;10:70–86.
40. Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:75–80.
41. Ibrahim M, Mussulini BH, Moro L, de Assis AM, Rosemberg DB, de Oliveira DL, *et al.* Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014;54:187–194.
42. Gebauer DL, Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Bonan CD, Lara DR. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:480–486.
43. Jabeen Q, Bashir S, Lyoussi B, Gilani AH. Coriander fruit exhibits gut modulatory, blood pressure lowering and diuretic activities. *J Ethnopharmacol* 2009;122:123–130.
44. Zargar-Nattaj SS, Tayyebi P, Zangoori V, Moghadamnia Y, Roodgari H, Jorsaraei SG, *et al.* The effect of *Coriandrum sativum* seed extract on the learning of newborn mice by electric shock: interaction with caffeine and diazepam. *Psychol Res Behav Manag* 2011;4:13–19.
45. Ishikawa T, Kondo K, Kitajima J. Water-soluble constituents of coriander. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003;51:32–39.
46. Abdalla FH, Schmatz R, Cardoso AM, Carvalho FB, Bal-dissarelli J, de Oliveira JS, *et al.* Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiol Behav* 2014;135:152–167.
47. Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Ubgade A, Quazi M, Umathe S, *et al.* Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety- and depression-like effect in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:955–960.
48. Kumar A, Goyal R. Quercetin protects against acute immobilization stress-induced behaviors and biochemical alterations in mice. *J Med Food* 2008;11:469–473.
49. Kawabata K, Kawai Y, Terao J. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J Nutr Biochem* 2010;21:374–380.
50. Merzoug S, Toumi ML, Tahraoui A. Quercetin mitigates Adriamycin-induced anxiety- and depression-like behaviors, immune dysfunction, and brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;387:921–933.
51. Maciel RM, Carvalho FB, Olabiyi AA, Schmatz R, Gutierrez JM, Stefanello N, *et al.* Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. *Biomed Pharmacother* 2016;84:559–568.
52. Wang XH, Zhang CX, Li GY, Huang JM, Zhai HF. [Review on anxiolytic effect of natural small-molecule phenols]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2017;42:1557–1565.
53. Fedotova J, Kubatka P, Busselberg D, Shleikin AG, Caprnda M, Dragasek J, *et al.* Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. *Biomed Pharmacother* 2017;95:437–446.

Address correspondence to:
 Kamila Cagliari Zenki, PhD
 Laboratory of Cellular Neurochemistry
 Department of Biochemistry
 Instituto de Ciências Básicas da Saúde
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
 Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo
 Porto Alegre - RS 90035-003
 Brazil

E-mail: kamizenki@gmail.com

REFERÊNCIAS

- Abdalla, F.H., Schmatz, R., Cardoso, A.M., Carvalho, F.B., Baldissarelli, J., de Oliveira, J.S., Rosa, M.M., Gonçalves Nunes, M.A., Rubin, M.A., da Cruz, I.B.M., Barbisan, F., Dressler, V.L., Pereira, L.B., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Gonçalves, J.F., Mazzanti, C.M., 2014. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase activities. *Physiol. Behav.* 135, 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.008>
- Abramovici, S., Bagić, A., 2016. Epidemiology of epilepsy, in: *Handbook of Clinical Neurology*. pp. 159–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00010-0>
- Ahmed, O., Seguin, D., Gerlai, R., 2011. An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 216, 166–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.028>
- Aldinio, C., French, E.D., Schwarcz, R., 1983. The effects of intrahippocampal ibotenic acid and their blockade by (-) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid: Morphological and electroencephalographical analysis. *Exp. Brain Res.* 51, 36–44. <https://doi.org/10.1007/BF00236800>
- Ambrogini, P., Torquato, P., Bartolini, D., Albertini, M.C., Lattanzi, D., Di Palma, M., Marinelli, R., Betti, M., Minelli, A., Cuppini, R., Galli, F., 2019. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865, 1098–1112. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.026>
- Amengual-Gual, M., Sánchez Fernández, I., Wainwright, M.S., 2019. Novel drugs and early polypharmacotherapy in status epilepticus. *Seizure* 68, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.08.004>
- Andersohn, F., Schade, R., Willich, S.N., Garbe, E., 2010. Use of antiepileptic drugs in epilepsy and the risk of self-harm or suicidal behavior. *Neurology* 75, 335–40. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea157e>
- Ashburn, T.T., Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new

- uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 673–683.
<https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Ashton, D., Willems, R., De Prins, E., Wauquier, A., 1988. Selective inhibition of synaptic versus non-synaptic epileptogenesis by NMDA antagonists in the in vitro hippocampus. *Epilepsy Res.* 2, 219–22.
- Babb, T.L., Ying, Z., Hadam, J., Penrod, C., 1998. Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex. *Epilepsy Res.* 32, 24–33.
- Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H., 2005. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759–768. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.031>
- Barba-Escobedo, P.A., Gould, G.G., 2012. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, Brain Behav.* 11, 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00770.x>
- Bardak, H., Uğuz, A.C., Bardak, Y., 2018. Protective effects of melatonin and memantine in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells against 2-ethylpyridine-induced oxidative stress: implications for age-related macular degeneration. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 37, 112–120.
<https://doi.org/10.1080/15569527.2017.1354218>
- Barnieh, L., Clement, F., Harris, A., Blom, M., Donaldson, C., Klarenbach, S., Husereau, D., Lorenzetti, D., Manns, B., 2014. A Systematic Review of Cost-Sharing Strategies Used within Publicly-Funded Drug Plans in Member Countries of the Organisation for Economic Co-Operation and Development. *PLoS One* 9, e90434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090434>
- Barratt, M.J., Frail, D., 2012. *Drug repositioning : bringing new life to shelved assets and existing drugs.* Wiley.
- Bekenstein, J.W., Lothman, E.W., 1991. An in vivo study of the ontogeny of long-term potentiation (LTP) in the CA1 region and in the dentate gyrus of the rat hippocampal formation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 63, 245–51.
- Berg, A.T., Millichap, J.J., 2013. *The 2010 Revised Classification of Seizures and*

- Epilepsy. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 19, 571–597.
<https://doi.org/10.1212/01.CON.0000431377.44312.9e>
- Betzen, C., White, R., Zehendner, C.M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H.J., Kuhlmann, C.R.W., 2009. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1212–1220.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.034>
- Blaser, R., Gerlai, R., 2006. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav. Res. Methods* 38, 456–69.
- Blaser, R.E., Peñalosa, Y.M., 2011. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiol. Behav.* 104, 831–837.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.07.029>
- Brady, R.J., Swann, J.W., 1986. Ketamine selectively suppresses synchronized afterdischarges in immature hippocampus. *Neurosci. Lett.* 69, 143–149.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90593-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90593-8)
- Brandt, C., Potschka, H., Löscher, 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, 727–40. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00027-7)
- 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15971.x>
- Caban, A., Pisarczyk, K., Kopacz, K., Kapuśniak, A., Toumi, M., Rémuzat, C., Kornfeld, A., 2017. Filling the gap in CNS drug development: evaluation of the role of drug repurposing. *J. Mark. Access Heal. Policy* 5, 1299833.
<https://doi.org/10.1080/20016689.2017.1299833>
- Canger, R., Vignoli, A., Bonardi, R., Guidolin, L., 1999. Felbamate in refractory partial epilepsy. *Epilepsy Res.* 34, 43–8.
- Chang-Mu, C., Jen-Kun, L., Shing-Hwa, L., Shoei-Yn, L.-S., 2010. Characterization of

- neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice. *Behav. Neurosci.* 124, 541–553. <https://doi.org/10.1037/a0020050>
- Chapman, A.G., 1998. Glutamate receptors in epilepsy. *Prog. Brain Res.* 116, 371–83.
- Chapman, A.G., Graham, J., Meldrum, B.S., 1990. Potent oral anticonvulsant action of CPP and CPPene in DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 178, 97–99. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)94798-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)94798-3)
- Chin, J., Scharfman, H.E., 2013. Shared cognitive and behavioral impairments in epilepsy and Alzheimer's disease and potential underlying mechanisms. *Epilepsy Behav* 26, 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.11.040>
- Choi-Kwon, S., Chung, C., Kim, H., Lee, S., Yoon, S., Kho, H., Oh, J., Lee, S., 2003. Factors affecting the quality of life in patients with epilepsy in Seoul, South Korea. *Acta Neurol. Scand.* 108, 428–34.
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369–79.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* 8, 185–96.
- Clifford, D.B., Olney, J.W., Benz, A.M., Fuller, T.A., Zorumski, C.F., 1990. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia* 31, 382–90.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90171-0)
- Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Neurobiology of Disease Low Doses of Memantine Disrupt Memory in Adult Rats. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4883-05.2006>
- Croucher, M., Collins, J., Meldrum, B., 1982. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science (80-.)*. 216, 899–901. <https://doi.org/10.1126/science.7079744>

- Czuczwar, S.J., Cavalheiro, E.A., Turski, L., Turski, W.A., Kleinrok, Z., 1985a. Phosphonic analogues of excitatory amino acids raise the threshold for maximal electroconvulsions in mice. *Neurosci. Res.* 3, 86–90.
- Czuczwar, S.J., Frey, H.-H., Löscher, W., 1985b. Antagonism of N-methyl-D,L-aspartic acid-induced convulsions by antiepileptic drugs and other agents. *Eur. J. Pharmacol.* 108, 273–280. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90449-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90449-2)
- Czuczwar, S.J., Meldrum, B., 1982. Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 83, 335–338. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(82\)90273-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90273-4)
- Danysz, W., Parsons, C.G., 2002. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotox. Res.* 4, 119–126. <https://doi.org/10.1080/10298420290015872>
- de Oliveira, D.L., Bavaresco, C., Mussulini, B.H., Fischer, A., Souza, D.O., Wyse, A.T.S., Wofchuk, S., 2011. Early life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus reduces acutely hippocampal glutamate uptake and Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Brain Res.* 1369, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.081>
- de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Gonçalves, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01484.x>
- Detour, J., Schroeder, H., Desor, D., Nehlig, A., 2005. A 5-Month Period of Epilepsy Impairs Spatial Memory, Decreases Anxiety, but Spares Object Recognition in the Lithium-pilocarpine Model in Adult Rats. *Epilepsia* 46, 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.38704.x>
- Devinsky, O., Kothari, M., Savino, L., Luciano, D., 1994. Felbamate for refractory absence seizures. *J. Epilepsy* 7, 189–194. [https://doi.org/10.1016/0896-6974\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0896-6974(94)90028-0)
- Dhir, A., Chopra, K., 2015. Memantine delayed N-methyl-D-aspartate -induced convulsions in neonatal rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29, 72–78.

<https://doi.org/10.1111/fcp.12090>

- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.012>
- DiMasi, J., 2001. New drug development in the United States from 1963 to 1999. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 286–296. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.115132>
- DiMasi, J.A., Hansen, R.W., Grabowski, H.G., 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* 22, 151–185.
[https://doi.org/10.1016/S0167-6296\(02\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0167-6296(02)00126-1)
- Ding, S., Fellin, T., Zhu, Y., Lee, S.-Y., Auberson, Y.P., Meaney, D.F., Coulter, D.A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., 2007. Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J. Neurosci.* 27, 10674–84.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2001-07.2007>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
- Doi, T., Ueda, Y., Tokumaru, J., Mitsuyama, Y., Willmore, L.J., 2001. Sequential changes in AMPA and NMDA protein levels during Fe(3+)-induced epileptogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 92, 107–14.
- dos Santos, J.G., Longo, B.M., Blanco, M.M., Menezes de Oliveira, M.G., Mello, L.E., 2005. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 1066, 37–48.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.037>
- Dudley, J.T., Deshpande, T., Butte, A.J., 2011. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. *Brief. Bioinform.* 12, 303–311.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbr013>
- Durães, F., Pinto, M., Sousa, E., 2018. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals* 11, 44.
<https://doi.org/10.3390/ph11020044>

- Eblen, F., Löschmann, P.-A., Wüllner, U., Turski, L., Klockgether, T., 1996. Effects of 7-nitroindazole, NG-nitro-l-arginine, and D-CPPene on harmaline-induced postural tremor, N-methyl-d-aspartate-induced seizures, and lisuride-induced rotations in rats with nigral 6-hydroxydopamine lesions. *Eur. J. Pharmacol.* 299, 9–16. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00795-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00795-4)
- Engel, J., 2011. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 52, 1195–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03065.x>
- Engel, J., International League Against Epilepsy (ILAE), 2001. 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.
- Fang, Y., Wang, X., 2015. Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus. *Seizure* 30, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.05.010>
- Fanselow, M.S., 2018. The role of learning in threat imminence and defensive behaviors. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 24, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.03.003>
- Fisher, R.S., 2015a. Redefining epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 130–135. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000174>
- Fisher, R.S., 2015b. Redefining epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 130–135. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000174>
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Flores-Soto, M.E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R.E., Beas-Zarate, C., 2012. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología* 27, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Freitas, R.M., Sousa, F.C.F., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F., 2006. Effect of

- gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Neurosci. Lett.* 408, 79–83.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2006.06.014>
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36, 186–95.
- 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, 207–19.
- Gao, X., Xu, X., Pang, J., Zhang, C., Ding, J.M., Peng, X., Liu, Y., Cao, J.M., 2007. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Physiol. Res.* 56, 559–569.
- Gascón, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Roda, J.M., Renart, J., Rodríguez-Peña, Á., Díaz-Guerra, M., 2005. Transcription of the NR1 Subunit of the *N*-Methyl-d-aspartate Receptor Is Down-regulated by Excitotoxic Stimulation and Cerebral Ischemia. *J. Biol. Chem.* 280, 35018–35027.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M504108200>
- Gaspard, N., Foreman, B., Judd, L.M., Brenton, J.N., Nathan, B.R., McCoy, B.M., Al-Otaibi, A., Kilbride, R., Fernández, I.S., Mendoza, L., Samuel, S., Zakaria, A., Kalamangalam, G.P., Legros, B., Szaflarski, J.P., Loddenkemper, T., Hahn, C.D., Goodkin, H.P., Claassen, J., Hirsch, L.J., LaRoche, S.M., 2013. Intravenous ketamine for the treatment of refractory status epilepticus: A retrospective multicenter study. *Epilepsia* 54, 1498–1503. <https://doi.org/10.1111/epi.12247>
- Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, Â.L., Schaefer, I.C., Bonan, C.D., Lara, D.R., 2011. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 480–486. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2011.04.021>
- 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, 335–40.
- Geter-Douglass, B., Witkin, J.M., 1999. Behavioral effects and anticonvulsant efficacies

- of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 146, 280–289. <https://doi.org/10.1007/s002130051118>
- Ghasemi, M., Schachter, S.C., 2011. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy Behav.* 22, 617–640. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.07.024>
- Gilbert, M.E., 1988. The NMDA-receptor antagonist, MK-801, suppresses limbic kindling and kindled seizures. *Brain Res.* 463, 90–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90530-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90530-6)
- Glasgow, N.G., Povysheva, N. V., Azofeifa, A.M., Johnson, J.W., 2017. Memantine and Ketamine Differentially Alter NMDA Receptor Desensitization. *J. Neurosci.* 37, 9686–9704. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1173-17.2017>
- Glauser, T., Shinnar, S., Gloss, D., Alldredge, B., Arya, R., Bainbridge, J., Bare, M., Bleck, T., Dodson, W.E., Garrity, L., Jagoda, A., Lowenstein, D., Pellock, J., Riviello, J., Sloan, E., Treiman, D.M., 2016. Evidence-Based Guideline: Treatment of Convulsive Status Epilepticus in Children and Adults: Report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society. *Epilepsy Curr.* 16, 48–61. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-16.1.48>
- Grimwood, S., Gilbert, E., Ragan, C.I., Hutson, P.H., 1996. Modulation of 45Ca^{2+} influx into cells stably expressing recombinant human NMDA receptors by ligands acting at distinct recognition sites. *J. Neurochem.* 66, 2589–95.
- Grone, B.P., Baraban, S.C., 2015. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat. Neurosci.* 18, 339–343. <https://doi.org/10.1038/nn.3934>
- Halonen, T., Nissinen, J., Pitkänen, A., 1999. Neuroprotective effect of remacemide hydrochloride in a perforant pathway stimulation model of status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res.* 34, 251–69.
- Hardingham, G.E., 2009. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1147–1160. <https://doi.org/10.1042/BST0371147>
- Hayashi, T., 1952. A physiological study of epileptic seizures following cortical

- stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.* 3, 46–64.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-0987-2>
- Henson, M.A., Roberts, A.C., Pérez-Otaño, I., Philpot, B.D., 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.004>
- Hingray, C., McGonigal, A., Kotwas, I., Micoulaud-Franchi, J.-A., 2019. The Relationship Between Epilepsy and Anxiety Disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 21, 40. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1029-9>
- 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. *Exp. Neurol.* 182, 124–34. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00104-3](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00104-3)
- Holmes, G.L., Noebels, J.L., 2016. The Epilepsy Spectrum: Targeting Future Research Challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a028043. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028043>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.10.021>
- Hosenbocus, S., Chahal, R., 2013. Memantine: a review of possible uses in child and adolescent psychiatry. *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 22, 166–71.
- Huang, Y.-J., Lin, C.-H., Lane, H.-Y., Tsai, G.E., 2012. NMDA Neurotransmission Dysfunction in Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 272–85. <https://doi.org/10.2174/157015912803217288>
- Huang, Y., Mucke, L., 2012. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* 148, 1204–1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>
- Hughes, P., Young, D., Dragunow, M., 1993. MK-801 sensitizes rats to pilocarpine

induced limbic seizures and status epilepticus. *Neuroreport* 4, 314–316.

<https://doi.org/10.1097/00001756-199303000-00022>

Hunt, R.F., Hortopan, G.A., Gillespie, A., Baraban, S.C., 2012. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199–206.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.013>

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.

<https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>

Jensen, P.J., Millan, N., Mack, K.J., 1997. Cortical NMDAR-1 gene expression is rapidly upregulated after seizure. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 44, 157–62.

Jiang, S.X., Zheng, R.-Y., Zeng, J.-Q., Li, X.-L., Han, Z., Hou, S.T., 2010. Reversible inhibition of intracellular calcium influx through NMDA receptors by imidazoline I2 receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 629, 12–19.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.063>

Johnson, J., Kotermanski, S., 2006. Mechanism of action of memantine. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.09.007>

Johnson, J.W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531. <https://doi.org/10.1038/325529a0>

Kalemenev, S. V., Zubareva, O.E., Sizov, V. V., Lavrent'eva, V. V., Lukomskaya, N.Y., Kim, K.K., Zaitsev, A. V., Magazanik, L.G., 2016. Memantine attenuates cognitive impairments after status epilepticus induced in a lithium–pilocarpine model. *Dokl. Biol. Sci.* 470, 224–227.

<https://doi.org/10.1134/S0012496616050148>

Kemp, J.A., Leeson, P.D., 1993. The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 20–5.

Khalili-Fomeshi, M., Azizi, M.G., Esmaeili, M.R., Gol, M., Kazemi, S., Ashrafpour, M., Moghadamnia, A.A., Hosseinzadeh, S., 2018. Piperine restores streptozotocin-

- induced cognitive impairments: Insights into oxidative balance in cerebrospinal fluid and hippocampus. *Behav. Brain Res.* 337, 131–138.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.09.031>
- Kim, J.-S., Kondratyev, A., Tomita, Y., Gale, K., 2007. Neurodevelopmental Impact of Antiepileptic Drugs and Seizures in the Immature Brain. *Epilepsia* 48, 19–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01285.x>
- Kodama, I., Kamiya, K., Toyama, J., 1997. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc. Res.* 35, 13–29. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00114-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00114-4)
- Koukopoulos, A., Serra, Giulia, Koukopoulos, A.E., Reginaldi, D., Serra, Gino, 2012. The sustained mood-stabilizing effect of memantine in the management of treatment resistant bipolar disorders: Findings from a 12-month naturalistic trial. *J. Affect. Disord.* 136, 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.09.040>
- Krishnamoorthy, E.S., Trimble, M.R., Blumer, D., 2007. The classification of neuropsychiatric disorders in epilepsy: A proposal by the ILAE Commission on Psychobiology of Epilepsy. *Epilepsy Behav.* 10, 349–353.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2006.10.002>
- Kubová, H., Druga, R., Lukasiuk, K., Suchomelová, L., Haugvicová, R., Jirmanová, I., Pitkänen, A., 2001. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J. Neurosci.* 21, 3593–9.
- Kubová, H., Mareš, P., Suchomelová, L., Brožek, G., Druga, R., Pitkänen, A., 2004. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3255–3265.
<https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03410.x>
- Leke, R., Schousboe, A., 2016. The Glutamine Transporters and Their Role in the Glutamate/GABA–Glutamine Cycle, in: *Advances in Neurobiology*. pp. 223–257.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_8
- 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, 174–8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90851-j](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90851-j)
- Lipton, S.A., 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 160–170. <https://doi.org/10.1038/nrd1958>
- 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, 6876–83.
- Loscher, W., Brandt, C., 2010. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacol. Rev.* 62, 668–700. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003046>
- Löscher, W., Hönack, D., 1990. High doses of memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane) induce seizures in kindled but not in non-kindled rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 341, 476–81.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D., 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 757–776. <https://doi.org/10.1038/nrd4126>
- Loss, C.M., Córdova, S.D., de Oliveira, D.L., 2012a. Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 1474, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.046>
- Loss, C.M., Córdova, S.D., de Oliveira, D.L., 2012b. Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 1474, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.046>
- 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.
- Manjarrez, J., Alvarado, R., Camacho-Arroyo, I., 2001. Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazol in the rat. *Epilepsy Res.* 46, 39–44.

- Mao, X., Moerman, A.M., Barger, S.W., 2002. Neuronal κ B-binding Factors Consist of Sp1-related Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 44911–44919.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204292200>
- Mareš, P., Mikulecká, 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. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.08.013>
- Mark, R.J., Ashford, J.W., Goodman, Y., Mattson, M.P., n.d. Anticonvulsants attenuate amyloid beta-peptide neurotoxicity, Ca²⁺ deregulation, and cytoskeletal pathology. *Neurobiol. Aging* 16, 187–98.
- Mathern, G., Pretorius, J.K., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L.M., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., Lévesque, M.F., Adelson, P.D., Peacock, W.J., 1997. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain* 120, 1937–1959.
<https://doi.org/10.1093/brain/120.11.1937>
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., Adelson, P.D., 1998. Increased Hippocampal AMPA and NMDA Receptor Subunit Immunoreactivity in Temporal Lobe Epilepsy Patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 615–634.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199806000-00008>
- Matsui, K., Jahr, C.E., Rubio, M.E., 2005. High-Concentration Rapid Transients of Glutamate Mediate Neural-Glial Communication via Ectopic Release. *J. Neurosci.* 25, 7538–7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1927-05.2005>
- Maximino, C., Benzecry, R., Matos Oliveira, K.R., De Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A.M., Broock Rosemberg, D., De Oliveira, D.L., Blaser, R., 2012. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour* 149, 1099–1123. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003029>
- Maximino, C., de Brito, T.M., Colmanetti, R., Pontes, A.A.A., de Castro, H.M., de Lacerda, R.I.T., Morato, S., Gouveia, A., 2010a. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behav. Brain Res.* 210, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.031>

- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C.A.G. de M., Gouveia, A., Morato, S., 2010b. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc.* 5, 209–216.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- 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, 179–85.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01080-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01080-4)
- 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., Shih, T.M., 1997. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 559–79.
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
- Mesraoua, B., Deleu, D., Kullmann, D.M., Shetty, A.K., Boon, P., Perucca, E., Mikati, M.A., Asadi-Pooya, A.A., 2019. Novel therapies for epilepsy in the pipeline. *Epilepsy Behav.* 97, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.042>
- Mikuni, N., Babb, T.L., Ying, Z., Najm, I., Nishiyama, K., Wylie, C., Yacubova, K., Okamoto, T., Bingaman, W., 1999. NMDA-receptors 1 and 2A/B coassembly increased in human epileptic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 40, 1683–7.
- Millan, M.H., Patel, S., Mello, L.M., Meldrum, B.S., 1986. Focal injection of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid into prepiriform cortex protects against pilocarpine-induced limbic seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 70, 69–74.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90439-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90439-8)
- Minjarez, B., Camarena, H.O., Haramati, J., Rodríguez-Yañez, Y., Mena-Munguía, S.,

- Buriticá, J., García-Leal, O., 2017. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.016>
- Morales-Villagrán, A., Ureña-Guerrero, M.E., Tapia, R., 1996. Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 305, 87–93. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00157-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00157-4)
- Morgan, S., Grootendorst, P., Lexchin, J., Cunningham, C., Greyson, D., 2011. The cost of drug development: A systematic review. *Health Policy (New York)*. 100, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.12.002>
- Morimoto, K., 1989. Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 253–60.
- Morphy, R., Kay, C., Rankovic, Z., 2004. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov. Today* 9, 641–651. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03163-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03163-0)
- Mothet, J.-P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., 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.* 97, 4926–4931. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4926>
- Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503–13.
- Mula, M., Hesdorffer, D.C., 2011. Suicidal behavior and antiepileptic drugs in epilepsy: analysis of the emerging evidence. *Drug. Healthc. Patient Saf.* 3, 15. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S13070>
- Murteira, S., Millier, A., Ghezaiel, Z., Lamure, M., 2014. Drug reformulations and repositioning in the pharmaceutical industry and their impact on market access: regulatory implications. *J. Mark. Access Heal. Policy* 2, 22813. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v2.22813>

- Mussulini, B.H.M., Vizuete, A.F.K., Braga, M., Moro, L., Baggio, S., Santos, E., Lazzarotto, G., Zenki, K.C., Pettenuzzo, L., Rocha, J.B.T. da, de Oliveira, D.L., Calcagnotto, M.E., Zuanazzi, J.A.S., Burgos, J.S., Rico, E.P., 2018. Forebrain glutamate uptake and behavioral parameters are altered in adult zebrafish after the induction of Status Epilepticus by kainic acid. *Neurotoxicology* 67, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.04.007>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00455.x>
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 748–755. <https://doi.org/10.1038/nrn916>
- Newton, C.R., Garcia, H.H., 2012. Epilepsy in poor regions of the world. *Lancet* 380, 1193–1201. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61381-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61381-6)
- Nwani, P.O., Nwosu, M.C., Enwereji, K.O., Asomugha, A.L., Arinzechi, E.O., Ogunniyi, A.O., 2013. Epilepsy treatment gap: prevalence and associated factors in Southeast Nigeria. *Acta Neurol. Scand.* 128, 83–90. <https://doi.org/10.1111/ane.12096>
- Olney, J.W., 1969. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science* (80-). 164, 719–721. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>
- Pál, B., 2018. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2917–2949. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2837-5>
- Panayiotopoulos, C.P., 2011. The new ILAE report on terminology and concepts for organization of epileptic seizures: A clinician’s critical view and contribution. *Epilepsia* 52, 2155–2160. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03288.x>
- Paoletti, P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>

- 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. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Parsons, C., Rammes, G., Danysz, W., 2008. Pharmacodynamics of Memantine: An Update. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 55–78. <https://doi.org/10.2174/157015908783769671>
- Parsons, C.G., 2019. CNS repurposing - Potential new uses for old drugs: Examples of screens for Alzheimer's disease, Parkinson's disease and spasticity. *Neuropharmacology* 147, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.027>
- 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., Quack, G., Bresink, I., Baran, L., Przegalinski, E., Kostowski, W., Krzascik, P., Hartmann, S., Danysz, W., 1995. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 34, 1239–58. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00092-k](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00092-k)
- Parsons, C.G., Stöffler, 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>
- Patel, M., 2016. Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 768–778. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.007>
- Pearce, J.M.S., 2002. Bromide, the first effective antiepileptic agent. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72, 412. <https://doi.org/10.1136/jnnp.72.3.412>
- Pellock, J.M., 1999. Felbamate. *Epilepsia* 40 Suppl 5, S57-62.

- Pellock, J.M., Faught, E., Leppik, I.E., Shinnar, S., Zupanc, M.L., 2006. Felbamate: Consensus of current clinical experience. *Epilepsy Res.* 71, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.06.020>
- Perucca, P., Scheffer, I.E., Kiley, M., 2018. The management of epilepsy in children and adults. *Med. J. Aust.* 208, 226–233.
- 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. <https://doi.org/10.1097/01.JGP.0000224350.82719.83>
- Pierson, T.M., Yuan, H., Marsh, E.D., Fuentes-Fajardo, K., Adams, D.R., Markello, T., Golas, G., Simeonov, D.R., Holloman, C., Tankovic, A., Karamchandani, M.M., Schreiber, J.M., Mullikin, J.C., PhD for the NISC Comparative Sequencing Program, C.J., Tiffit, C.J., Toro, C., Boerkoel, C.F., Traynelis, S.F., Gahl, W.A., 2014. GRIN2A mutation and early-onset epileptic encephalopathy: personalized therapy with memantine. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 190–198. <https://doi.org/10.1002/acn3.39>
- Pitkänen, A., Nehlig, A., Brooks-Kayal, A.R., Dudek, F.E., Friedman, D., Galanopoulou, A.S., Jensen, F.E., Kaminski, R.M., Kapur, J., Klitgaard, H., Löscher, W., Mody, I., Schmidt, D., 2013. Issues related to development of antiepileptogenic therapies. *Epilepsia* 54, 35–43. <https://doi.org/10.1111/epi.12297>
- Platzer, K., Yuan, H., Schütz, H., Winschel, A., Chen, W., Hu, C., Kusumoto, H., Heyne, H.O., Helbig, K.L., Tang, S., Willing, M.C., Tinkle, B.T., Adams, D.J., Depienne, C., Keren, B., Mignot, C., Frengen, E., Strømme, P., Biskup, S., Döcker, D., Strom, T.M., Mefford, H.C., Myers, C.T., Muir, A.M., LaCroix, A., Sadleir, L., Scheffer, I.E., Brilstra, E., van Haelst, M.M., van der Smagt, J.J., Bok, L.A., Møller, R.S., Jensen, U.B., Millichap, J.J., Berg, A.T., Goldberg, E.M., De Bie, I., Fox, S., Major, P., Jones, J.R., Zackai, E.H., Abou Jamra, R., Rolfs, A., Leventer, R.J., Lawson, J.A., Roscioli, T., Jansen, F.E., Ranza, E., Korff, C.M., Lehesjoki, A.E., Courage, C., Linnankivi, T., Smith, D.R., Stanley, C., Mintz, M., McKnight, D., Decker, A., Tan, W.H., Tarnopolsky, M.A., Brady, L.I., Wolff, M., Dondit, L., Pedro, H.F., Parisotto, S.E., Jones, K.L., Patel, A.D., Franz, D.N., Vanzo, R.,

- Marco, E., Ranells, J.D., Di Donato, N., Dobyns, W.B., Laube, B., Traynelis, S.F., Lemke, J.R., 2017. GRIN2B encephalopathy: Novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J. Med. Genet.* 54, 460–470. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104509>
- Postnikova, T.Y., Zubareva, O.E., Kovalenko, A.A., Kim, K.K., Magazanik, L.G., Zaitsev, A. V, 2017. Status Epilepticus Impairs Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus and Is Followed by Changes in Expression of NMDA Receptors. *Orig. Russ. Text* © 82, 418–428. <https://doi.org/10.1134/S0006297917030063>
- Prentice, H., Modi, J.P., Wu, J.-Y., 2015. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/964518>
- Puttachary, S., Sharma, S., Stark, S., Thippeswamy, T., 2015. Seizure-Induced Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2015/745613>
- Qing, H., He, G., Ly, P.T.T., Fox, C.J., Staufenbiel, M., Cai, F., Zhang, Z., Wei, S., Sun, X., Chen, C.-H., Zhou, W., Wang, K., Song, W., 2008. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* 205, 2781–2789. <https://doi.org/10.1084/jem.20081588>
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Reddy, D.S., Shetty, A.K., 2006. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 83, 1088–1105. <https://doi.org/10.1002/jnr.20802>
- Reyes, R.C., Brennan, A.M., Shen, Y., Baldwin, Y., Swanson, R.A., 2012. Activation of neuronal death. *J. Neurosci.* 32, 12973–12978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1597-12.2012>
- Rogawski, M.A., 1993. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 325–31.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H.M., Piato, Â.L., Calcagnotto, M.E.,

- Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., de Oliveira, D.L., 2011. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLoS One* 6, e19397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019397>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrd2462>
- Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G., 1998a. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J. Neurosci.* 18, 8382–93.
- Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G., 1998b. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J. Neurosci.* 18, 8382–93.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1–29.
- Shameer, K., Readhead, B., Dudley, J.T., 2015. Computational and experimental advances in drug repositioning for accelerated therapeutic stratification. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 5–20.
- Singh, P., Mann, K.A., Mangat, H.K., Kaur, G., 2003. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. *Mol. Cell. Biochem.* 243, 139–45.
- Smith, A.M., Gibbons, H.M., Dragunow, M., 2010. Valproic acid enhances microglial phagocytosis of amyloid- β 1–42. *Neuroscience* 169, 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.041>
- 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, 335–41.
- 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, 335–44.

- Stephenson, J.F., Whitlock, K.E., Partridge, J.C., 2011. Zebrafish Preference for Light or Dark Is Dependent on Ambient Light Levels and Olfactory Stimulation. *Zebrafish* 8, 17–22. <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0671>
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A. V, 2012. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62, 135–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.037>
- Stewart, E., Lah, S., Smith, M. Lou, 2019. Patterns of impaired social cognition in children and adolescents with epilepsy: The borders between different epilepsy phenotypes. *Epilepsy Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.01.031>
- Swinyard, E.A., Sofia, R.D., Kupferberg, H.J., 1986. Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of felbamate and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats. *Epilepsia* 27, 27–34.
- Tanaka, A., Ito, Y., Kawasaki, H., Kitabayashi, C., Nishioka, R., Yamazato, M., Ishizawa, K., Nagai, T., Hirayama, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Araki, N., 2018. Effects of Memantine on Nitric Oxide Production and Hydroxyl Radical Metabolism during Cerebral Ischemia and Reperfusion in Mice. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 27, 1609–1615. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.014>
- Tariot, P.N., Schneider, L.S., Cummings, J., Thomas, R.G., Raman, R., Jakimovich, L.J., Loy, R., Bartocci, B., Fleisher, A., Ismail, M.S., Porsteinsson, A., Weiner, M., Jack, C.R., Thal, L., Aisen, P.S., Alzheimer’s Disease Cooperative Study Group, 2011. Chronic Divalproex Sodium to Attenuate Agitation and Clinical Progression of Alzheimer Disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 853. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.72>
- Tellez-Zenteno, J.F., Patten, S.B., Jetté, N., Williams, J., Wiebe, S., 2007. Psychiatric Comorbidity in Epilepsy: A Population-Based Analysis. *Epilepsia* 0, 070728063136006-??? <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01222.x>
- Temkin, N.R., 2009. Preventing and treating posttraumatic seizures: The human experience. *Epilepsia* 50, 10–13. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.02005.x>

- Theodore, W.H., Raubertas, R.F., Porter, R.J., Nice, F., Devinsky, O., Reeves, P., Bromfield, E., Ito, B., Balish, M., 1991. Felbamate: a clinical trial for complex partial seizures. *Epilepsia* 32, 392–7.
- Theodore, W.H., Spencer, S.S., Wiebe, S., Langfitt, J.T., Ali, A., Shafer, P.O., Berg, A.T., Vickrey, B.G., 2006. Epilepsy in North America: A Report Prepared under the Auspices of the Global Campaign against Epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the International League Against Epilepsy, and the World Health Organization. *Epilepsia* 47, 1700–1722. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00633.x>
- Todorova, M.T., Tandon, P., Madore, R.A., Stafstrom, C.E., Seyfried, T.N., 2000. The ketogenic diet inhibits epileptogenesis in EL mice: A genetic model for idiopathic epilepsy. *Epilepsia* 41, 933–940. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb00275.x>
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/epi.13121>
- Turski, W.A., Urbanska, E., Dziki, M., Parada-Turska, J., Ikonomidou, C., 1990. Excitatory amino acid antagonists protect mice against seizures induced by bicuculline. *Brain Res.* 514, 131–4. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90444-g](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90444-g)
- Velísek, L., Velísková, J., 2008. New avenue of research: antiepileptic drug and estradiol neuroprotection in epilepsy. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 3, 128–37.
- Watkins, J.C., Jane, D.E., 2009. The glutamate story. *Br. J. Pharmacol.* 147, S100–S108. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706444>
- Xiao, F., An, D., Chen, S., Ren, J., Zhou, D., 2015. Clinical and Electroencephalographic (EEG) Features Associated With Refractoriness in Benign Childhood Epilepsy With Centrotemporal Spikes. *J. Child Neurol.* 30, 1591–1597. <https://doi.org/10.1177/0883073815575367>
- Yen, W., Williamson, J., Bertram, E.H., Kapur, J., 2004. A comparison of three NMDA receptor antagonists in the treatment of prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res.*

59, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2004.03.004>

Yin, S., Niswender, C.M., 2014. Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell. Signal.* 26, 2284–2297. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.04.022>

Ying, Z., Babb, T.L., Mikuni, N., Najm, I., Drazba, J., Bingaman, W., 1999. Selective Coexpression of NMDAR2A/B and NMDAR1 Subunit Proteins in Dysplastic Neurons of Human Epileptic Cortex. *Exp. Neurol.* 159, 409–418. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7188>

Zaitsev, A. V., Kim, K.K., Vasilev, D.S., Lukomskaya, N.Y., Lavrentyeva, V. V., Tumanova, N.L., Zhuravin, I.A., Magazanik, L.G., 2015. N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers prevent pentylentetrazole-induced convulsions and morphological changes in rat brain neurons. *J. Neurosci. Res.* 93, 454–465. <https://doi.org/10.1002/jnr.23500>

Zheng, H., Fridkin, M., Youdim, M., 2014. From single target to multitarget/network therapeutics in Alzheimer's therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 7, 113–35. <https://doi.org/10.3390/ph7020113>

Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm.* 121, 799–817. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>

Zhu, L.-J., Chen, Z., Zhang, L.-S., Xu, S.-J., Xu, A.-J., Luo, J.-H., 2004. Spatiotemporal changes of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylentetrazole-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 356, 53–56. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2003.11.029>