Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

Modelo animal de epilepsia e psicose comórbida: aspectos neuropatológicos, comportamentais e modulação pelo tratamento com nitroprussiato de sódio

Priscila Alves Balista

Ribeirão Preto
2016

Priscila Alves Balista

Modelo animal de epilepsia e psicose comórbida: aspectos neuropatológicos, comportamentais e modulação pelo tratamento com nitroprussiato de sódio

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas

Área de Concentração: Neurologia
Opção: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak
Coorientadora: Dra. Ludmyla Kandratavicius

Ribeirão Preto
2016

Ficha de Aprovação

Modelo animal de epilepsia e psicose comórbida: aspectos neuropatológicos, comportamentais e modulação pelo tratamento com nitroprussiato de sódio

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas

Área de Concentração: Neurologia
Opção: Neurociências

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak

Examinador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Examinador: Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Examinador: Prof. Dr. João Paulo Maia de Oliveira

Examinador: Prof. Dr. Acioly Luiz Tavares de Lacerda

Aprovado em _____

Ter talento é acertar num alvo que ninguém acertou. Ser gênio é acertar num alvo que ninguém viu.
(Arthur Schopenhauer)

DEDICATÓRIA

A minha mãe Edna que me viu primeiro,
a minha inspiração,
que optou ser feliz por me ver brilhar.
Hoje voo sozinha, mas minhas asas são você.
Minha eterna gratidão ao meu primeiro
amor na vida e para sempre o mais importante.

Ao meu irmão Ridan pela amizade, confiança,
à quem não temo declarar o meu amor.
Somos dois e também apenas um, não
vivo sem que esteja sempre ao
meu lado a melhor parte de mim!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pelo direcionamento, conquistas e me fazer chegar até o fim. Fé torna as coisas possíveis e ciência e DEUS se atraem.

Ao **Prof. Jaime Eduardo Cecílio Hallak** sou profundamente grata por sua orientação, atenção, disposição, por caminhar junto e enorme incentivo, exemplo de seriedade e competência científica.

À **Dra. Ludmyla Kandravicius** sou profundamente grata pela espetacular coorientação, pela competência científica, pelo crescimento acadêmico, suporte, apoio, presença constante do começo ao fim, pela amizade inestimável e para sempre.

Ao **Prof. João Pereira Leite** pelo apoio, suporte e todo conhecimento científico adquirido desde o mestrado.

Ao **Dr. José Eduardo Peixoto-Santos** pelo apoio, incentivo, presença, suporte durante o trabalho, pela amizade valiosa e para sempre

À **Renata Caldo Scanduzzi** pelos ensinamentos, eficiência, apoio, incentivo, presença, suporte durante todo o trabalho, pela amizade valiosa e para sempre

Às **Dras. Mariana Raquel Monteiro e Raquel Do-Val da Silva** pelo apoio e suporte durante o trabalho e pela grande amizade.

Aos **Drs. Glen Baker e Serdar Dursun** sou profundamente grata por me acolherem na Universidade de Alberta (Canadá) e me proporcionarem conhecimento e crescimento científico. Obrigada pelo acompanhamento no doutorado sanduiche.

A **Silvana Loturco e Renato Meirelles** funcionários do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento sempre disponíveis e atenciosos.

À agência de fomentos CAPES pelo apoio financeiro direito e também apoio no doutorado sanduiche para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

Modelo animal de epilepsia e psicose comórbida: aspectos neuropatológicos, comportamentais e modulação pelo tratamento com nitroprussiato de sódio

Introdução: A esquizofrenia é um dos principais transtornos mentais e promove distúrbios comportamentais e cognitivos. Apesar do grande impacto social, pouco se conhece sobre a patofisiologia e etiologia da esquizofrenia. Pacientes com desordens psicóticas têm aumentado risco de desenvolver epilepsia, e pacientes com epilepsia do lobo temporal tem alta frequência de psicoses. A utilização de modelos experimentais animais de esquizofrenia e epilepsia pode ajudar a entender a neurobiologia dessas doenças e ter papel importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. As interações complexas das crises epiléticas e quadros psicóticos tem sido aos poucos desvendadas. O óxido nítrico (NO) é um importante modulador da neurotransmissão e doadores de NO como o nitroprussiato de sódio (NPS) tem efeitos promissores em pacientes com esquizofrenia. Em modelos animais de epilepsia, NO pode ter efeito pró ou anticonvulsivante, sugerindo que o uso de NPS em pacientes com epilepsia e psicose pode não ser tão simples. **Objetivos:** Desenvolver um modelo animal de epilepsia e psicose comórbida, e compará-lo do ponto de vista comportamental e neuropatológico com modelos animais puros de epilepsia e esquizofrenia. Além disso, verificar a possível modulação desencadeada pelo tratamento com NPS nos modelos citados. **Metodologia:** Ratos Wistar machos (260-300g) foram divididos em grupos controle (SAL+SAL), epilepsia puro (PILO+SAL), esquizofrenia (SAL+QUET), epilepsia e psicose comórbida (PILO+QUET) e suas versões tratadas com NPS (SAL+SAL+NPS, PILO+SAL+NPS, SAL+QUET+NPS e PILO+QUET+NPS). Esses animais foram avaliados em diferentes aspectos comportamentais (campo aberto, teste de inibição pré-pulso, memória de reconhecimento de objeto e memória de trabalho), e filmados ao longo de 71 dias para o monitoramento de crises epiléticas espontâneas recorrentes. Também foram avaliadas a perda neuronal e a expressão de nNOS em diferentes regiões cerebrais. **Resultados:** NPS reduziu a frequência de crises nos animais com epilepsia e psicose comórbida quando comparados a animais não tratados. NPS também teve efeito ansiolítico no modelo animal de epilepsia com e sem psicose, e diminuiu os correlatos comportamentais de sintomas positivos dos animais no modelo de psicose e no de epilepsia + psicose, além de reverter o prejuízo no filtro sensorio motor nos animais que receberam pilocarpina e quetamina. No reconhecimento de objeto o modelo de epilepsia e epilepsia+psicose o tratamento com NPS não interferiu no desempenho de memória de curto prazo, porém NPS melhorou a memória de longo prazo no modelo de psicose. NPS preservou regiões como o córtex entorrinal e *subiculum* nos animais epiléticos, mas a camada granular e córtex pré-límbico revelaram perda significativa nos animais controles. Alta expressão de nNOS em diferentes regiões cerebrais foram visualizadas nos animais com epilepsia, com destaque para aqueles que receberam tratamento com NPS. **Conclusão:** O tratamento com NPS foi efetivo na amenização de sintomas correlatos comportamentais de psicose no modelo puro de esquizofrenia e no comórbido

com epilepsia. Além disso, não exacerbou crises e contribuiu para diminuição delas nos animais do modelo de epilepsia e psicose, que apresentou grandes similaridades com o que é encontrado em casos clínicos. Nossos resultados sugerem que o uso do NPS pode ter resultados na melhoria dos sintomas da psicose interictal humana, assim como já observado para a esquizofrenia.

Palavras-chave: psicose, epilepsia, comorbidade psiquiátrica, modelo animal, quetamina, pilocarpina, nitroprussiato de sódio.

ABSTRACT

Animal models of epilepsy and comorbid psychosis: neuropathological features, behavioural aspects and modulation by treatment with sodium nitroprusside

Introduction: Schizophrenia is a major mental disorder that affects 1% of young adults and has a great impact on quality of life, behavior, and cognition. Despite the high social burden, little is known about the pathophysiology and etiology of schizophrenia. Patients with psychotic disorders have increased risk of developing epilepsy, and patients with temporal lobe epilepsy have a high frequency of psychoses. The use of experimental animal models of epilepsy and schizophrenia may help to better understand the neurobiology of these diseases and play an important role in the development of potential new therapeutic strategies. The complex interactions of seizures and psychotic symptoms are being unveiled. Nitric oxide (NO) is an important modulator of neurotransmission and NO donors such as sodium nitroprusside (SNP) have shown promising effects in schizophrenic patients. In animal models of epilepsy, NO may exert pro- or anticonvulsant effects, suggesting that the use of SNP in patients with epilepsy and psychosis may not be so straightforward. **Objectives:** To develop an animal model of epilepsy and comorbid psychosis, and compare it from the behavioral and neuropathological point of view with pure animal models of epilepsy and schizophrenia. It was hoped, to verify the possible modulation triggered by the treatment with SNP. **Methodology:** Males Wistar rats weighing 260-300g were divided in controls group (SAL+SAL), pure epilepsy (PILO+SAL), schizophrenia (SAL+QUET), comorbid psychosis (PILO+KET) and their versions treated with SNP (SAL+SAL+SNP, PILO+SAL+SNP, SAL+KET+SNP and PILO+KET+SNP). These animals were evaluated in a variety of behavioral tests (open field, prepulse inhibition startle reflex, object recognition and working memory), and were filmed over 71 days to monitor spontaneous recurrent seizures. We also evaluated neuronal loss and nNOS expression in different brain regions. **Results:** SNP reduced seizure frequency in animals with epilepsy and psychosis when compared to those not treated with SNP. SNP also showed anxiolytic effects in the animal model of epilepsy with or without psychosis, decreased behavioral correlates of positive symptoms in the animal model of epilepsy + psychosis, and prevented sensorimotor gating deficits in epilepsy + psychosis

model, The object recognition test showed that in epilepsy and epilepsy + psychosis models the treatment with SNP did not interfere with short-term memory performance, but SNP improved long-term memory in the psychosis model. SNP preserved brain regions like entorhinal cortex and *subiculum* in epileptic animals, but the granular layer and prelimbic cortex revealed significant loss in controls animals. High expression of NOS in same brain regions was observed in the animal model of epilepsy, especially in the animals receiving SNP. **Conclusion:** Treatment with SNP was effective in ameliorating symptoms of behavioral correlates of psychosis in the pure model of schizophrenia and the model comorbid with epilepsy. Moreover, SNP did not exacerbate seizures and reduced seizure frequency in the animal model of epilepsy + psychosis, which showed striking similarities to clinical cases. Our results suggest that the use of SNP could ameliorate symptoms of human interictal psychosis, such as those observed in schizophrenia.

Key words: psychosis, epilepsy, psychiatric comorbidity, animal model, ketamine, pilocarpine, sodium nitroprusside.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ESQUIZOFRENIA	1
1.1.1 Aspectos fisiopatológicos da esquizofrenia	2
1.1.2 Hipótese dopaminérgica e glutamatérgica da esquizofrenia	3
1.2 EPILEPSIA E PSICOSES	5
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS	6
1.3.1 Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal	6
1.3.2 Modelo experimental de esquizofrenia.....	7
1.3.3 Modelo experimental de epilepsia e comorbidades psiquiátricas.....	9
1.4 ÓXIDO NÍTRICO	10
1.5 DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS)	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 ANIMAIS.....	16
4.2 ESQUEMA EXPERIMENTAL	16
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE IMPLANTAÇÃO DE CÂNULAS	17
4.4 MODELOS ANIMAIS E ESQUEMA EXPERIMENTAL.....	18
4.4.1 Modelo animal de epilepsia.....	18
4.4.2 Modelo animal de esquizofrenia	19
4.4.3 Modelo animal de comorbidade.....	19
4.5 PROTOCOLOS DE TESTES REALIZADOS NOS MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA E EPILEPSIA	20
4.5.1. Atividade locomotora	20
4.5.2 Teste de inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI).....	21
4.5.3 Teste de reconhecimento de objeto.....	22
4.5.4 Memória espacial de trabalho (labirinto radial de oito braços)	23
4.6 PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL	25
4.7 MÉTODO HISTOQUÍMICO DE HEMATOXILINA E EOSINA	26
4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	26
4.8.1 Anticorpo	27
4.9 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
4.9.1 Análises comportamentais.....	27
4.9.2 Contagem neuronal em secções coradas por Hematoxilina e Eosina	28
4.9.3 Análise estatística.....	28

5. RESULTADOS	29
5.1 PERFIL DOS ANIMAIS INJETADOS COM PILO	29
5.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	32
5.2.1 <i>Atividade locomotora I</i>	33
5.2.2 <i>Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) I</i>	34
5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	35
5.3.1. <i>Atividade locomotora II</i>	36
5.3.2. <i>Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) II</i>	37
5.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	38
5.4.1 <i>Atividade locomotora III</i>	38
5.4.2 <i>Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) III</i>	39
5.5 TESTES DE MEMÓRIA	41
5.5.1 <i>Reconhecimento de objeto</i>	41
5.5.2 <i>Labirinto radial de oito braços</i>	42
5.6 DENSIDADE NEURONAL	45
5.7 EXPRESSÃO DE NÑOS	52
6. DISCUSSÃO	58
6.1 PERFIL DOS ANIMAIS	59
6.2 CAMPO ABERTO	62
6.3 PPI	65
6.4 TESTES DE MEMÓRIA	67
6.4.1 <i>Reconhecimento de objeto</i>	67
6.4.2 <i>Labirinto</i>	70
6.5 NEUROPATOLOGIA	72
7. CONCLUSÃO	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	80
ANEXO I: ARTIGOS PUBLICADOS	97
ANEXO II: FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do nitroprussiato	14
Figura 2. Grupos Experimentais.....	16
Figura 3. Desenho experimental de animais sem tratamento	16
Figura 4. Desenho experimental de animais tratados com NPS.....	17
Figura 5. Cirurgia para implante de cânula	18
Figura 6. Arena para avaliação da atividade locomotora	21
Figura 7. Caixa de isolamento acústico com gaiola de contenção para rato.	22
Figura 8. Esquema do protocolo de reconhecimento de objeto.....	25
Figura 9. Labirinto radial de 8 braços	23
Figura 10. Crises espontâneas recorrentes.....	32
Figura 11. Campo aberto I.....	34
Figura 12. Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto I.....	35
Figura 13. Campo aberto II	36
Figura 14. Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto II.....	37
Figura 15. Campo aberto III	39
Figura 16. Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto III.....	40
Figura 17. Memória de reconhecimento de objeto.....	42
Figura 18. Tempo para obtenção do 1º pellet no labirinto radial.....	43
Figure 19. Tempo total de tomada dos 4 pellets no labirinto radial	44
Figura 20. Número de erros no labirinto radial	45
Figura 21. Densidade neuronal em regiões cerebrais de ratos tratados com pilocarpina, quetamina e salina	46
Figura 22. Densidade neuronal em regiões do sistema límbico de ratos controles tratados com quetamina e nitroprussiato.....	47
Figura 23. Densidade neuronal em regiões do sistema límbico de ratos tratados com pilocarpina, quetamina e nitroprussiato e grupo controle.....	48
Figure 24. Fotomicrografia da camada granular do GD, marcadas pela coloração de HE	49
Figura 25. Fotomicrografia da região CA1, marcadas pela coloração de HE.....	50
Figura 26. Fotomicrografia da região infra-límbica marcadas pela coloração de HE.....	51
Figura 27. Área imunorreativa para nNOS em regiões límbicas de ratos tratados com pilocarpina e quetamina e grupo controle.....	52

Figura 28. Área imunorreativa para nNOS em regiões límbicas de ratos controles tratados com quetamina e nitroprussiato.....	53
Figura 29. Área imunorreativa marcada para nNOS em regiões límbicas de ratos tratados com pilocarpina, quetamina, nitroprussiato e grupo controle	54
Figura 30. Fotomicrografia da camada granular do GD, pela marcação de nNOS.....	55
Figura 31. Fotomicrografia da região CA1, pela marcação de nNOS.....	56
Figura 32. Fotomicrografia da região infra-límbica, pela marcação de nNOS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do perfil de crises de cada animal injetado com PILO. 29

Tabela 2. Número de ratos utilizados no protocolo experimental 32

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACC: *nucleus accumbens*

AMG: amígdala

CA1: corno de Ammon área 1

CA2: corno de Ammon área 2

CA3: corno de Ammon área 3

Ca²⁺: íon cálcio

c-fos: proteína proto-oncogênica

Cg1: córtex cingulado

CN⁻: ânions cianeto

CG: camada granular

CREs: crises recorrentes espontâneas

D2: receptor de dopamina

ECT: córtex ectorrinal

ELT: epilepsia do lobo temporal

ELTM: epilepsia do lobo temporal mesial

ENT: córtex entorrinal

Fe²⁺: íon ferroso

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IL: córtex infralímbico

i.h.: injeção intrahipocampal

i.p.: injeção intraperitoneal

MK801: antagonista de receptor NMDA

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH-d: nicotinamida adenina dinucleotídeo diaforase

NH₃: amônia

NMDA: receptores N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NO⁺: íon nitrosila

NOS: sintase de óxido nítrico

eNOS: sintase endotelial de óxido nítrico

iNOS: sintase induzível de óxido nítrico

nNOS: sintase neuronal de óxido nítrico

NPS: nitroprussiato de sódio

pH: potencial hidrogeniônico

PBS: tampão fosfato salina

PCP: fenilciclidina

PPI: inibição pré-pulso de sobressalto

PILO: pilocarpina

PILO+SAL: animais injetados com pilocarpina e salina

PILO+QUET: animais injetados com pilocarpina e quetamina

PILO+SAL+NPS: animais injetados com pilocarpina, salina e nitroprussiato de sódio

PILO+QUET+NPS: animais injetados com pilocarpina, quetamina e nitroprussiato de sódio

PRH: córtex perirrinal

PRL: córtex pré-límbico

QUET: quetamina

RE: núcleo talâmico *reuniens*

REM: movimento rápido dos olhos

SAL: salina

SAL+SAL: animais injetados com salina e salina

SAL+QUET: animais injetados com salina e quetamina

SAL+SAL+NPS: animais injetados com salina, salina e nitroprussiato de sódio

SAL+QUET+NPS: animais injetados com salina, quetamina e nitroprussiato de sódio

SE: *status epilepticus*

SUB: *subiculum*

TDM: núcleo talâmico dorsomedial

TVM: núcleo talâmico ventromedial

†: símbolo indicativo de morte do animal

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença mental crônica com efeito devastante de ordem emocional, perceptiva, cognitiva e de interação social, atingindo 1% da população no mundo em idade produtiva (Pitsikas, 2015). Como uma desordem mental e comportamental está entre as 10 principais causas de incapacidade por anos vividos (Hallak, 2009). Associada a comorbidade médica e índices de mortalidade, pacientes com esquizofrenia apresentam duplo risco de mortalidade comparado a controles saudáveis (Citrome *et al.*, 2015). Poucos estudos têm estimando a prevalência da doença no país, e a maior parte foram conduzidos há mais de 10 anos atrás (Matos *et al.*, 2015). Dados recentes indicam que 0,816% pessoas sofrem com a doença o que corresponde cerca 1,61 milhões de pessoas esquizofrênicas no Brasil (Hallak, 2009; Tay-Teo *et al.*, 2014). A desordem acomete indivíduos em idade produtiva, adolescentes ou no início da vida adulta, manifestando-se de modo crônico e devastador ao longo da vida (Hallak, 2009).

Em 1911, o psiquiatra suíço Euge Bleuler associou o termo “esquizofrenia” à ideia de mente dividida, fragmentada ou partida, através dos relatos de pacientes esquizofrênicos (Georgieff, 1995). As manifestações clínicas da esquizofrenia baseiam-se em sintomas categorizados como positivos, negativos e cognitivos (Lewis & Lieberman, 2000). Os sintomas positivos destacam-se pelas distorções do pensamento (delírios), de percepção auditiva (alucinações), distorções da linguagem e do autocontrole do comportamento (desorganizado ou catatônico). Para os sintomas negativos são relatados redução da expressividade emocional (embotamento afetivo), da produtividade do discurso, do pensamento e da falta de iniciativa para realização de objetivos (Harvey *et al.*, 2006). Os pacientes esquizofrênicos, na sua maioria, são estigmatizados. Esses estigmas agravam o quadro de isolamento social, relacionamento familiar, aprendizado e chances de empregabilidade. O tratamento farmacológico é baseado na estratégia terapêutica da doença, seja pelo uso de drogas antipsicóticas de primeira geração bloqueando receptores dopaminérgicos ou agentes de segunda geração bloqueando receptores serotoninérgicos ou se ligando a outros perfis de receptores.

Apesar de todo avanço, apenas 30% dos pacientes respondem aos antipsicóticos com completa remissão, outros 30% apresentam respostas favoráveis e em torno de 20-30% não respondem a todos os medicamentos (Steeds *et al.*, 2015). Novos alvos terapêuticos e a compreensão de processos biológicos durante a patogênese da doença são necessários para desenvolver novas terapias, melhorar a qualidade de vida do paciente e romper a resistência ao tratamento (Shim *et al.*, 2015; Steeds *et al.*, 2015).

1.1.1 Aspectos fisiopatológicos da esquizofrenia

Apesar do número de pessoas acometidas, dos prejuízos intelectuais, sociais, econômicos e toda a importância da doença, a causa da esquizofrenia ainda permanece desconhecida. No entanto, torna-se claro que durante a sua gênese possíveis alterações anatômicas (como atrofia cerebral e alargamento dos ventrículos cerebrais) e bioquímicas (hiperatividade dopaminérgica) podem ser identificadas no cérebro (Swerdlow *et al.*, 2008; De Oliveira *et al.*, 2011). A desordem não é focal e nem uniforme e se apresenta principalmente no hipocampo, córtex pre-frontal e tálamo dorsal. O padrão de anormalidade é sugestivo de distúrbio de conectividade dentro e entre regiões, mas comumente originado durante o desenvolvimento do cérebro. O fenótipo de neurônios afetados e sinapses é incerto, embora existam evidências do envolvimento do sistema glutamatérgico no hipocampo. Mudanças na citoarquitetura têm sido propostas, apesar de especulativas como aberração neuroanatômica ao invés de neuropatológica, bem como resultados de imagem funcional, neuroquímicos e achados neuropatológicos (Harrison, 1999). Estudos de ressonância magnética em pacientes esquizofrênicos mostraram baixo volume de substância cinzenta (especialmente no giro temporal superior, lobo temporal médio e estruturas límbicas: amígdala, hipocampo e giro parahipocampal), redução de volume nos lobos frontal e parietal, falta de assimetria cortical normal, alargamento do caudado e desenvolvimento anormal como o cavo do septo pelúcido que prejudicam o aprendizado e outras medidas cognitivas. De acordo com Glantz e colaboradores (2006) essa redução volumétrica estaria ligada ao volume neuronal, ramificações dendrítica e axonais e não propriamente a uma redução do número de neurônios o que sugere alteração sináptica na patogênese da esquizofrenia. Estudos de imagem também tem demonstrado baixa atividade do córtex pré-frontal e ativação anormal do lobo temporal durante a execução de tarefa verbal e visual (Flashman *et al.*, 2007). Pacientes esquizofrênicos apresentam redução tônica na atividade do córtex pré-frontal, baixo desempenho na execução de tarefas de memória

de trabalho e déficit na região cortical quando comparados a controles (Liddle, 1992). Também são identificadas alterações morfológicas na amígdala e reduções no metabolismo em áreas corticais límbicas, possivelmente envolvidas com a fisiopatologia da doença. Sugere-se que disfunções neuronais na amígdala e no córtex cingulado anterior podem responder pelos déficits de atenção, embotamento afetivo e comportamento antissocial de esquizofrênicos (Grace, 2000). Segundo Mitchell e colaboradores (2000), projeções do hipocampo (*subiculum* e córtex entorrinal) para o *nucleus accumbens* também podem estar envolvidas no controle comportamental psicomotor, o que pode estar implicado na etiologia da doença.

Também na esquizofrenia são relatadas disfunções neuroquímicas como a redução de N-acetil aspartato no lobo frontal e temporal, hipocortisolemia, desregulação no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e um aumento nos receptores D2 no estriado. Também disfunções neurofisiológicas como inibição de pré-pulso, diminuição da amplitude P300, anormalidades do sono REM e na autópsia, redução da densidade dendrítica acompanhada de normal ou aumentada densidade neuronal e ausência de gliose (Tandon *et al.*, 2008).

É provável que a manifestação da esquizofrenia se deva a uma combinação de fatores genéticos e ambientais que desencadeiam a doença (Farber *et al.*, 1995; De Oliveira *et al.*, 2011). As várias abordagens investigativas como modelos animais, estudos genéticos, de neuroimagem e psicofarmacológicos são os mais empregados para a compreensão dos mecanismos desta patologia, essenciais para o desenvolvimento de tratamentos efetivos. Estudos apontam a existência de um desequilíbrio nos vários sistemas neurotransmissores para esclarecer as causas da desordem (Marcotte *et al.*, 2001; Dawe *et al.*, 2009; Lodge & Grace, 2011). Uma das principais hipóteses está centralizada nos neurotransmissores dopamina, glutamato e serotonina, que teriam papel chave no entendimento dos mecanismos da doença (Olney *et al.*, 1999; Javitt, 2007; Gunduz-Bruce, 2009).

1.1.2 Hipótese dopaminérgica e glutamatérgica da esquizofrenia

A relação entre efetividade clínica de drogas antipsicóticas e sua afinidade por receptores D2 tem sido estabelecida há mais de 30 anos (Steeds *et al.*, 2015). Uma hipótese bem fundamentada é a teoria dopaminérgica em que a hiperatividade na via subcortical do neurotransmissor dopamina, mediada por receptores D2 (via

mesolímbica), seria responsável pelos sintomas da esquizofrenia (Gunduz-Bruce, 2009; Lodge & Grace, 2011). Esta teoria baseia-se em duas observações: a) o uso contínuo de agonistas dopaminérgicos induzem sintomas positivos similares aos da doença (alucinações e delírios); b) o uso de antipsicóticos (antagonistas dopaminérgicos) bloqueiam alguns receptores D2 e são eficazes no tratamento dos sintomas positivos esquizofrênicos (Abi-Dargham & Laruelle, 2005). De acordo com Davis e colaboradores (2001) um déficit da atividade da via dopaminérgica mesocortical ou a diminuição da atividade do receptor D1 também estão relacionados com os sintomas negativos e cognitivos na esquizofrenia (Abi-Dargham & Laruelle, 2005). A teoria dopaminérgica pode fornecer explicação para um dos sintomas positivos da psicose (delírios) devido a hiperatividade de transmissão dopaminérgica no mesolímbico (Kapur *et al.*, 2005). Em contraste, tem sido sugerido que uma baixa atividade dopaminérgica no córtex frontal pode estar relacionada a sintomas negativos (Steeds *et al.*, 2015). Em roedores, a administração de estimulantes dopaminérgicos induzem comportamento estereotipado de locomoção, farejamento e mastigação relacionados com os sintomas positivos de psicose, além de prejuízo no filtro sensorio motor avaliado pela inibição de pré-pulso (PPI) também visto em pacientes com esquizofrenia (Segal & Mandell, 1974). Modelos dopaminérgicos são úteis para o desenvolvimento de drogas antipsicóticas com alvo em dopamina para o direcionamento da eficácia e segurança de agentes terapêuticos (Steeds *et al.*, 2015).

Outras pesquisas também ressaltam a importância do glutamato na neurobiologia da esquizofrenia (Kim *et al.*, 1980; Olney & Farber, 1995). Os resultados das investigações têm demonstrado uma baixa função dos neurônios glutamatérgicos e/ou receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato. Segundo a teoria glutamatérgica, quando receptores NMDA são ocupados por antagonistas do tipo fenilciclidina e quetamina (QUET), são exibidos fenótipos da esquizofrenia e níveis reduzidos de glutamato são detectados na circuitaria neuronal de ratos (Newcomer *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000). O mecanismo ainda é incerto, embora a inibição de receptores NMDA pela QUET reduza a função de interneurônios gabaérgicos.

A teoria dopaminérgica é amplamente aceita, e a manipulação do sistema glutamatérgico em conjunto com a utilização de um doador de óxido nítrico pode mimetizar aspectos comportamentais e neuroquímicos presentes na esquizofrenia (Marcotte *et al.*, 2001). De acordo com Bujas-Bubanovic (2000) o efeito do doador de

óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS) elimina completamente a síndrome comportamental em ratos tratados com fenilciclidina, assim como em ratos tratados com QUET (Kandratavicius *et al.*, 2014b). O uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (quetamina, fenilciclidina ou MK801) mediados pelo sistema nitrérgico (NO) podem estar ligados a efeitos comportamentais semelhantes à doença e explicar aspectos fisiopatológicos envolvidos na esquizofrenia (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000; Keilhoff *et al.*, 2004a).

1.2 Epilepsia e psicoses

A epilepsia é uma doença neurológica crônica associada a disfunções funcionais/cognitivas, e estigma social (Guarnieri *et al.*, 2004; Marchetti *et al.*, 2005). A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é forma mais comum de epilepsia em adultos e atinge aproximadamente 60% de indivíduos (Engel, 2001). Pacientes com ELTM apresentam um quadro anatomopatológico de perda neuronal e gliose (esclerose hipocampal) nas regiões de CA1, prosúbulo e região hilar do hipocampo, bem como reorganização axonal aberrante no giro denteado (Leite & Cavalheiro, 1995; Mathern *et al.*, 2002).

O hipocampo é uma estrutura do lobo temporal essencial para a consolidação da memória (Lodge & Grace, 2011). Alterações funcionais e estruturais são observações frequentes no hipocampo de pacientes com esquizofrenia, o que pode estar associado aos déficits de tarefa de memória (Lodge & Grace, 2011). Em pacientes com epilepsia, a presença de psicose é frequente em casos com tumores temporais e esclerose hipocampal (Kandratavicius *et al.*, 2012a).

Como revisto por Kandratavicius e colaboradores (Kandratavicius *et al.*, 2012b), pacientes com área epileptogênica localizada no lobo temporal estão mais propensos a desenvolverem transtornos psíquicos como depressão maior, ansiedade e psicose. Sendo assim, comorbidades psiquiátricas em pacientes portadores de ELTM podem se tornar mais frequentes, em resposta a uma condição crônica das crises epilépticas. Estima-se que destes pacientes cerca de 30 a 70% apresentam alterações de ordem cognitiva e/ou psíquica que surgem após anos do início das crises (Kandratavicius *et al.*, 2007). Esse intervalo pode ser justificado em decorrência de um foco irritativo no cérebro, dano

cerebral ou cronicidade da doença (De Oliveira & Gouveia, 2003; De Castro *et al.*, 2008).

A associação de transtornos psiquiátricos e epilepsia é um problema de grande importância clínica. Geralmente a epilepsia se manifesta em idade jovem e o surto psicótico tende a aparecer em idade tardia. Como as manifestações psicóticas em epilepsia se apresentam como uma forma próxima da esquizofrenia (*schizophrenia-like*), o modelo experimental de esquizofrenia pode ser uma ferramenta útil para o estudo de psicoses em epilepsia. O estudo de um modelo de epilepsia associada à comorbidades psiquiátricas pode ajudar a compreender os mecanismos neuropatológicos e auxiliar o desenvolvimento de novos diagnósticos e tratamentos que melhorem a qualidade de vida dos pacientes. O uso de modelo translacional animal baseado em estudos humanos oferece medidas objetivas para diferentes sintomas, além de prever a eficácia terapêutica de novos antipsicóticos pode dar uma visão chave nas alterações em circuitos cerebrais específicos na esquizofrenia (Curran *et al.*, 2009).

1.3 Modelos experimentais

1.3.1 Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

Os modelos experimentais animais permitem estudar de forma controlada as variáveis epileptogênicas e lesões associadas à fisiopatologia da epilepsia que não podem ser reproduzidos em seres humanos. Esses modelos são desenvolvidos para o estudo da patogênese da epilepsia do lobo temporal e incluem indução por quimioconvulsivantes como pilocarpina (PILO) e ácido cáínico, abrasamento elétrico e modelos de hipóxia/isquemia perinatal (Sharma *et al.*, 2007). Entretanto, para serem eficientes em desvendar os mecanismos envolvidos nesta doença, os modelos animais devem reproduzir muito bem as características da epilepsia (Bertram, 2007).

A administração sistêmica de PILO, um agonista muscarínico colinérgico, é muito utilizada em modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal (ELT), pois induz mudanças neuropatológicas e comportamentais em ratos muito semelhantes às observadas em humanos com ELTM (Leite & Cavalheiro, 1995). Neste modelo, é induzido nos animais um episódio de *status epilepticus* (SE), que é seguido por um período latente e posterior desenvolvimento de crises recorrentes espontâneas (CREs) (Turski *et al.*, 1989; Cavalheiro *et al.*, 1991).

O SE convulsivo em animais tem sido um importante método experimental para elucidação da função da atividade sináptica excitatória na morte neuronal associada às crises (Meldrum & Brierley, 1973; Olney *et al.*, 1974).

Apesar de reproduzir a ELT de maneira consistente, altas doses de pilocarpina (acima de 300 mg/kg) são necessárias para indução de SE (Clifford *et al.*, 1987; Leite *et al.*, 1990a; Cavalheiro *et al.*, 1991) e estão associadas a altas taxas de mortalidade (Clifford *et al.*, 1987; Turski *et al.*, 1989). Furtado e colaboradores (2002) mostraram que a injeção intrahipocampal de PILO em ratos reproduz o mesmo quadro fisiopatológico observado após injeção intraperitoneal, porém com grande redução da mortalidade dos animais. Além disso, esta estratégia nos permite reduzir a dose injetada assim como controlar a área-alvo a ser acometida inicialmente.

1.3.2 Modelo experimental de esquizofrenia

Em 1969 Meginney e Brunnel descreveram que um modelo experimental ideal seria aquele com similaridades a etiologia, fisiopatologia, sintomatologia e tratamento da doença (Geyer *et al.*, 2001). De fato, um modelo baseia-se numa preparação desenvolvida para estudar uma condição particular, podendo ser executado em seres humanos, animais de laboratório, cultura celular ou simulado matematicamente em computadores (Geyer *et al.*, 2001). Para os modelos que visam mimetizar certas doenças mentais, o efeito produzido pode se aproximar àquele da condição humana (Salgado *et al.*, 2006). Entretanto, dificuldades próprias de se reproduzir experimentalmente as características da doença como diferentes etiologias, fatores genéticos, ambientais e as funções superiores (cognitivas), podem interferir na representação da desordem mental. Sendo assim, pesquisadores têm focado seus estudos em modelos quantitativos de fenótipos, endofenótipos, através de induções farmacológicas, genéticas ou cirúrgicas, o que pode mimetizar endofenótipos comuns à doença (Da Silva, 2006; Jones *et al.*, 2011). Em modelos animais, antagonistas de receptores NMDA induzem mudanças comportamentais, locomotora e cognitiva, enquanto a administração crônica induz mudanças neurobiológicas similares aos cérebro de pacientes esquizofrênicos (Jones *et al.*, 2011).

São vários os modelos que buscam reproduzir sintomas semelhantes à esquizofrenia em animais de laboratório. Nos modelos animais de esquizofrenia, hiperatividade, hiperlocomoção, déficits no filtro sensorio-motor, danos cognitivos e

comportamento estereotipado são considerados como representativos de sintomas positivos em humanos (Howland *et al.*, 2004; Dawe *et al.*, 2009). Os modelos convencionais de esquizofrenia envolvem a modulação farmacológica do sistema dopaminérgico e/ou glutamatérgico, fortemente ligados ao transtorno esquizofrênico. Além disso, o envolvimento de bases genéticas, lesões em hipocampus de ratos (neonatais) e o envolvimento do neurotransmissor glutamato são modelos representativos envolvidos nesta desordem psiquiátrica (Lipska, 2004; Jones *et al.*, 2011).

A abordagem farmacológica também tem sido utilizada em modelos animais, uma vez que o tratamento farmacológico ou estados induzidos por fármacos como anfetaminas produzem sintomas parecidos aos da esquizofrenia em pacientes que não sofrem com a doença (Geyer & Ellenbroek, 2003). A utilização de substâncias psicoativas, como anfetaminas, antagonistas de receptores NMDA, fenilciclidina e QUET são utilizados em humanos para modularem a atividade do sistema dopaminérgico, ficando a sua disfunção a cargo de produzir sintomas similares ao transtorno (Hetem *et al.*, 2000).

A QUET é um derivado da fenilciclidina, produzida em 1965 pelo laboratório Parke & Davis, e de neurofarmacologia bastante complexa. Considerada um poderoso “anestésico dissociativo” é capaz de induzir perda sensorial marcante, analgesia, paralisia do movimento e amnésia sem perda real da consciência (Morgan *et al.*, 2004). Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição não competitiva dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Bergman, 1999). De acordo com Stone e colaboradores (2012) doses agudas de QUET aplicadas em indivíduos saudáveis induz sintomas positivos e negativos que direcionam para déficits cognitivos semelhantes na esquizofrenia. Entretanto sua ligação a receptores NMDA também aumenta níveis de glutamato no pré-frontal, correlacionado com altas taxas de sintomas positivos o que sugere que diferentes sintomas têm mecanismos básicos distintos (Deakin *et al.*, 2008).

Com o intuito de esclarecer os mecanismos fisiopatológicos da doença, alguns estudos têm utilizado a QUET como uma excelente indutora de quadros psicóticos em seus modelos de esquizofrenia; quer seja para humanos quer seja para animais (Bergman, 1999; Keilhoff *et al.*, 2004a). A hipótese dopaminérgica, baseada no uso de anfetaminas ou no bloqueio de receptores D2 dopaminérgico, tem sido a primeira escolha para explicar os quadros apresentados pela doença. Entretanto, nota-se uma

disfunção glutamatérgica relacionada aos sintomas positivos e negativos, semelhantes à doença, quando o modelo é induzido pela QUET (Vasconcelos *et al.*, 2005). É constatado que pacientes que sofrem de esquizofrenia apresentam baixas concentrações de glutamato no líquido cefalorraquidiano e apresentam efeitos comportamentais relacionados à doença (Bressan & Pilowsky, 2003a). De acordo com Olney e colaboradores (1999) a hipofunção dos receptores NMDA, causada pelo bloqueio de fenilciclidina também pode explicar a hipótese glutamatérgica, assim como os surtos psicóticos em pacientes esquizofrênicos.

Apresentando perspectivas promissoras em experimentação animal, a QUET é um importante indutor de sintomas psicóticos. Na dose intraperitoneal de 30 mg/kg os animais apresentam hiperatividade locomotora e movimentos estereotipados (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000; Keilhoff *et al.*, 2004b). Essas evidências despertam o interesse pelo uso da substância e consideram este fármaco como um bom indutor para o modelo de esquizofrenia. Portanto, a QUET pode ser alvo para a compreensão dos mecanismos e na descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antipsicóticos.

Nos roedores e em humanos que apresentam hiperatividade dopaminérgica induzida por estes fármacos, é identificada a inibição pré-pulso (PPI, do inglês, *prepulse inhibition of startle*). Neste sentido a utilização do teste de pré-pulso de sobressalto permite localizar a ação desses agentes sobre o fenótipo que se pretende estudar (Braff *et al.*, 2001b; Geyer & Ellenbroek, 2003).

1.3.3 Modelo experimental de epilepsia e comorbidades psiquiátricas

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas comórbidas em epilepsia são desconhecidos, e até o presente não há nenhum modelo na literatura de epilepsia e psicose comórbida. A relação entre psicose e epilepsia pode ser investigada em modelos animais por meio de abrasamento elétrico do hipocampo (*kindling*), uso de substâncias farmacológicas para sensibilização da via dopaminérgica e tratamento agudo ou crônico com o uso de antagonistas de receptor NMDA. O abrasamento elétrico em circuitos específicos evidencia a participação do sistema dopaminérgico envolvido em mecanismos importantes da epilepsia e da psicose. Anormalidades no circuito córtico-frontal mesolímbico, observado em modelos experimentais, podem ser úteis para esclarecer como uma disfunção dopaminérgica pode estar relacionada a altas taxas de psicose em pacientes com ELT (Edeh & Toone,

1987; Kandravicius *et al.*, 2012b). Dano e desregulação de estruturas anatômicas específicas no sistema nervoso central podem predispor o cérebro com epilepsia do lobo temporal às crises psicóticas (Kandravicius *et al.*, 2012b).

Outra investigação aponta uma incidência de epilepsia de 6,99 para cada 1000 pessoas/ano em um grupo de pacientes com esquizofrenia, em contraste com 1,99 a cada 1000 pessoas/ano no grupo sem esquizofrenia. Portanto indivíduos com esquizofrenia apresentam mais chances (3,5 vezes maior) de desenvolverem epilepsia (Chang *et al.*, 2011). É provável que a relação direta entre epilepsia e esquizofrenia se deva a uma patogênese comum e uma suscetibilidade de fatores genéticos, ambientais e causas neurobiológicas ainda não esclarecidas (Chang *et al.*, 2011).

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador do sistema cardiovascular, atuando no relaxamento vascular e na proteção dos vasos sanguíneos (Moncada *et al.*, 1991). No entanto, a sua instabilidade em meio biológico, reagindo com o oxigênio molecular e metais redox, reduzem além da sua ação vascular, seu controle sobre a pressão arterial, agregação/inibição plaquetária, neurotransmissão, aprendizado e memória (Moncada *et al.*, 1991; Nathan & Xie, 1994). Com um curto tempo de meia vida no organismo (5-10 segundos), o NO torna-se inviável ao estudo de suas funções fisiológicas, uma vez que, em contato com a água e o oxigênio a sua molécula é convertida em nitrito e nitratos. A liberação controlada de NO é de grande interesse, pois controla a liberação desse gás (Napoli & Ignarro, 2003). Ao contrário de neurotransmissores convencionais solúveis em água que não atravessam a barreira lipídica, o NO desempenha os dois papéis atuando em neurônios adjacentes e diretamente em componentes intracelulares de célula a célula (Pitsikas, 2015). Com funções definidas cardiovascular, imunológico e cerebral, o NO é considerado um gás instável e um neurotransmissor atípico (Mayer & Hemmens, 1997). Produzido somente quando requisitado, trata-se de um gás lábil que difere dos neurotransmissores clássicos. Após ativação de receptores de glutamato (como o NMDA), é produzido de maneira rápida, não é armazenado em vesículas e nem tão pouco liberado por exocitose. O NO exerce papel fisiológico importante dentro do sistema nervoso central e, sob condições normais, promove a liberação de neurotransmissor como glutamato, a expressão de

genes, a percepção de dor, a plasticidade sináptica e o aprendizado (Lincoln *et al.*, 1998).

No sistema nervoso central e periférico, o radical livre NO atua como mensageiro químico entre os neurônios pré- e pós-sináptico formando ligações covalentes com as enzimas guanilato ciclase (Snyder & Ferris, 2000). As enzimas responsáveis pela síntese do óxido nítrico são conhecidas como sintases de óxido nítrico (NOS) e estão divididas em três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). Tendo como substrato o oxigênio molecular e a L-arginina, todas as isoformas de sintase de óxido nítrico sintetizam NO e L-citrulina através de uma reação dependente do cofator de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (Nathan, 1992). No sistema nervoso, a nNOS é responsável pela produção de óxido nítrico através da ativação dos receptores glutamatérgicos via NMDA. No neurônio pré-sináptico ocorre a liberação por meio de vesículas específicas do neurotransmissor excitatório (glutamato), que se difunde pelo espaço sináptico em direção ao receptor NMDA localizado no neurônio pós-sináptico. Esta ligação torna o receptor permeável a cálcio (Ca^{2+}) que se liga a calmodulina no interior das células. Este complexo Ca^{2+} -calmodulina ativa a isoforma nNOS encontrada nas células nervosas, catalisando a reação que produz óxido nítrico (Esplugues, 2002).

Estratégias experimentais complementares aos modelos de neurotransmissão dopaminérgico e glutamatérgico podem ajudar na reprodução dos aspectos neuroquímicos e comportamentais da esquizofrenia (Bressan & Pilowsky, 2003b; Salum *et al.*, 2008). É certo que alterações na distribuição de NO e a sua interação com outros sistemas neurotransmissores podem ter um papel fisiopatológico não somente na esquizofrenia, mas em outras doenças neurológicas e neuropsiquiátricas como epilepsia, traumas cranianos, Parkinson, ansiedade e depressão (Leite *et al.*, 2002a; West *et al.*, 2002).

Como um mensageiro retrógrado, o óxido nítrico é capaz de induzir pré-sinápticamente a liberação de glutamato, afetando a excitabilidade neuronal (Van Leeuwen *et al.*, 1995). Na epilepsia, o papel do NO tem sido investigado em modelos animais por meio do uso inibidores de NOS, que podem tanto reduzir (Del-Bel *et al.*, 1997; Proctor *et al.*, 1997) quanto potencializar (Noh *et al.*, 2006) crises epiléticas induzidas por quimioconvulsivantes. (Van Leeuwen *et al.*, 1995). De acordo com Leite e colaboradores (2002a) o número e a intensidade de neurônios imunomarcados para

nNOS estão aumentados em pacientes com epilepsia do lobo temporal com esclerose hipocampal, ao contrário daqueles que apresentam seus hipocampos preservados.

Pesquisas têm sido conduzidas para identificar um marcador biológico na esquizofrenia (Wiley *et al.*, 1997; Bernstein *et al.*, 2005). Uma ênfase especial tem sido dada ao impacto do metabolismo de NO nos processos degenerativos da esquizofrenia, dentre eles: migração celular, formação de sinapses, neurotransmissão mediada por receptores NMDA e habilidades cognitivas (Bernstein *et al.*, 2005).

Adicionalmente também é constatado no plasma de pacientes esquizofrênicos um aumento significativo de NO (Akyol *et al.*, 2002). Por outro lado, alterações como uma baixa densidade de neurônios NADPH-diaforase (NADPH-d) no córtice frontal e temporal e um aumento dessas células na substância branca em regiões frontais e temporais, parecem estar relacionadas com uma diminuição de níveis estáveis de metabólitos de NO (nitratos e nitritos) no fluido cérebro espinhal de pacientes esquizofrênicos (Ramirez *et al.*, 2004; Salum *et al.*, 2008).

O NO veio revolucionar o conceito de sinalização neuronal, emergindo como importante mediador em desordens neurológicas como derrames e epilepsia (Dawson & Dawson, 1996). Além de estar intimamente conectado aos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico é possível que o NO esteja implicado com o transtorno neurológico da esquizofrenia (Noh *et al.*, 2006).

1.5 Doador de óxido nítrico Nitroprussiato de sódio (NPS)

Um dos doadores de óxido nítrico mais utilizado na clínica médica, principalmente para melhorar a função cardíaca, é o NPS. O NPS é utilizado em hospitais para gerar uma rápida diminuição da pressão arterial em crises hipertensivas (Furtado *et al.*, 2003). Sabe-se que a sua produção não ocorre de maneira espontânea, havendo a necessidade de participação de compostos químicos contendo grupos sulfidril, como a cisteína e glutatona (Butler & Megson, 2002). De acordo com Ignarro e colaboradores (1991) a importância do grupo tiol, proveniente da cisteína, reage com nitritos e nitratos orgânicos formando S-nitrosotióis que se decompõe liberando óxido nítrico. No composto S-nitrosotiol a primeira liberação espontânea do NO ocorre por meio de auto-decomposição térmica ou fotoquímica (Vilhena, 2006).

O NPS é um sal cristalino vermelho acastanhado que pode ser armazenado por muitos anos sob temperatura, luz e umidade controlados (Feelisch, 1998). É um complexo inorgânico constituído de íons ferroso (Fe^{2+}), ligado a cinco ânions cianeto (CN^-) e um íon nitrosila (NO^+). De acordo com Battes e colaboradores (1991) a interação do NPS com agentes redutores (íons tióis) pode levar a formação do óxido nítrico.

O NPS é conhecido desde 1850, e seu efeito hipotensor foi descrito em 1929. A ação vasodilatadora de NPS pode ser explicada pela ação de grupos nitrosos que ao entrar em contato com eritrócitos, promove a decomposição do NPS, liberando o óxido nítrico responsável pela dilatação das veias e artérias (Gilman *et al.*, 1991). O NPS requer metabolização catalizada por enzimas presentes na membrana plasmática das células endoteliais e musculares lisas para liberar o NO. O íon ferroso presente na molécula de NPS reage com grupos sulfidrilícos ligados à membrana da parede vascular e dos eritrócitos, formando um radical nitroprussiato instável (Figura 1), que sofre dissociação em seus dois componentes cianeto e óxido nítrico (Gilman *et al.*, 1991). Em pequenas quantidades, os cianetos são metabolizados nas hemácias e posteriormente transformados em tiocianato no fígado que será excretado pelo rim (Gilman *et al.*, 1991). Porém altas concentrações de CN^- também podem desencadear toxicidade ao organismo, assim como o tratamento crônico com NPS pode propiciar disfunção endotelial (Bates *et al.*, 1991; Fukatsu *et al.*, 2007).

De acordo com Feelisch e colaboradores (1998) a solução de NPS é extremamente fotossensível e uma ligeira acidificação do meio (pH 3-5) com exclusão da molécula de oxigênio pode aumentar a sua estabilidade. A luz é uma condição primordial para a liberação de NO a partir de NPS, sendo o processo dependente de reações fotoquímicas. Neste caso é recomendado que soluções aquosas de NPS sejam preparadas para uso imediato e conservadas em ambiente escuro (Harrison & Bates, 1993; Feelisch, 1998).

De acordo com Al-Nuaimi e colaboradores (2010) a utilização racional de doadores de óxido nítrico como o NPS em roedores pode bloquear os efeitos comportamentais de fenilciclidina, fármaco indutor de sintomas positivos e negativos similares à esquizofrenia, melhorando os déficits cognitivos (Al-Nuaimi *et al.*, 2010).

Nitrovasodilatadores como o NPS são fontes exógenas de NO que podem mediar diversas funções biológicas que envolvem o NO. Dessa forma, a sua seletividade, liberação controlada e permanência em níveis subtóxicos tornam-se importantes na eficácia da ação terapêutica.

Existe uma série de estudos sobre a eficácia dos doadores de NO em efeitos psicomiméticos envolvidos com a hipofunção do sistema glutamatérgico em ratos. A administração intraperitoneal de NPS (2-6mg/kg) reverte a hipermotilidade, esteriotipia, a expressão de c-fos em regiões corticais induzidas pelo antagonista de receptor NMDA fenilciclidina (5mg/kg i.p.) (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000). Além disso tem sido reportado que o pré-tratamento com NPS (4mg/kg i.p.) previne efeitos psicomiméticos (hipermotilidade e esteriotipia) produzido pela QUET (25mg/kg i.p.) antagonista receptor de NMDA (Maia-de-Oliveira *et al.*, 2014b). Finalmente, nosso laboratório mostrou recentemente que o pós-tratamento com NPS (5mg/kg i.p.) e não com trinitroglicerina (10mg/kg i.p.) atenua a hiperlocomção induzida por QUET (Kandratavicius *et al.*, 2014b).

a)

b)

Figura 1. a) Estrutura tridimensional do ânion nitroprussiato; b) Estrutura plana do nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$).

2. JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia e a epilepsia são doenças extremamente debilitantes, e provavelmente tem substratos patológicos em comum. Até o momento, não existem

modelos animais de epilepsia e psicose comórbida. A detecção de esclerose hipocampal presente na ELT e perturbações no sistema córtico-límbico-talâmico, sugere o possível desenvolvimento de sintomas psicóticos através da interação de fatores genéticos e ambientais (Kandratavicius *et al.*, 2012b). A nossa proposta de trabalho visou desenvolver um modelo animal de epilepsia e psicose comórbida, e compará-lo do ponto de vista comportamental e neuropatológico com modelos animais de epilepsia e esquizofrenia puros. Além disso, verificamos a possível modulação desencadeada pelo tratamento com uma droga doadora de óxido nítrico nos três modelos.

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- a) Avaliar as características comportamentais e neuropatológicas em 3 modelos experimentais: de esquizofrenia induzido por quetamina, de epilepsia induzido por injeção intrahipocampal de pilocarpina e do novo modelo de epilepsia e psicose comórbida.
- b) Verificar o efeito do tratamento com nitroprussiato de sódio nos modelos propostos.

Objetivos específicos:

- a) Avaliar as respostas comportamentais em ratos submetidos a testes de inibição do pré-pulso de sobressalto, memória de curta duração (teste de reconhecimento de objeto), memória espacial de trabalho (labirinto radial de oito braços) e hiperlocomoção.
- b) Caracterizar a expressão imunohistoquímica da proteína de sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS), bem como estimar a densidade neuronal, em secções coradas por Hematoxilina e Eosina, nas regiões do hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, tálamo da linha média, córtex pré-frontal e *nucleus accumbens* de ratos nos 3 modelos experimentais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de 2 meses, pesando entre 260-300g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Estes animais foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm) contendo raspas de madeira (maravalha) sobre o assoalho. Durante todo o período dos experimentos, os animais ficaram alojados em biotério com temperatura controlada em $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e, submetidos a ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro com luzes acesas às 07:00 h. Os ratos tiveram livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA#102/2012, Anexo II).

4.2 Esquema experimental

Figura 2. Grupos Experimentais

Figura 3. Desenho experimental de animais sem tratamento

Figura 4. Desenho experimental de animais tratados com NPS

4.3 Protocolo experimental de implantação de cânulas

Após injeção intraperitoneal de QUET (100 mg/kg, intraperitoneal, Ketamina Agener União 10%, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal, Dopaser 2%, Brasil), foi feita a verificação do grau de anestesia no rato por meio de pinçamento de cauda. O animal foi submetido à tricotomia do escalpo e fixação do crânio em estereotático (KOPF instruments, EUA). Em seguida, foi realizado o procedimento de assepsia do escalpo com iodo e água oxigenada. Logo após, foi administrada injeção subcutânea de anestésico (lidocaína 2% em NaCl 0,15 M) no local da incisão. O rato, então, foi submetido à incisão do escalpo para a exposição e limpeza da superfície do crânio. Tomando-se o bregma como referência ântero-posterior e médio-lateral, foi implantada uma cânula de 12 mm na região posterior dorsal do hipocampo (hilo), segundo as coordenadas (ântero-posterior: - 5,5 mm, médio lateral: - 4,5 mm; dorso-ventral: - 2,3 mm) (Paxinos *et al.*, 1985). Em seguida dois orifícios adicionais sobre o córtex parietal foram feitos para fixação de microparafusos e então todo procedimento foi fixado com cimento acrílico (Figura 5).

Os ratos após a cirurgia receberam uma injeção única subcutânea do analgésico/antipirético flunixin meglumina (Banamine 2,5 mg/kg, Schering Plough 10mg/mL, Brasil) e permaneceram em caixas individuais no biotério por 7 dias para recuperação antes do início dos experimentos. Todos os animais passaram pelo procedimento de implante de cânula.

Figura 5. Cirurgia para implante de cânula (Laboratório de Investigação em Epilepsia, Ribeirão Preto, São Paulo).

4.4 Modelos animais e esquema experimental

4.4.1 Modelo animal de epilepsia

Para a indução do *status epilepticus* (SE), os animais receberam inicialmente uma microinjeção intrahipocampal de PILO 8 mg/kg (2,4 mg/ μ l diluída em SAL 0,9%; Pilocarpine hydrochloride, Sigma Aldrich, EUA). O sistema de microinjeção consistiu de uma tubulação de polietileno (PE 10) de aproximadamente 30 cm de comprimento, com a agulha de injeção (gengival 30G curta Injex) de 13 mm conectada a uma seringa Hamilton 10 μ L.

O animal foi imobilizado e a agulha acoplada à seringa foi introduzida na cânula. A PILO foi injetada manualmente na velocidade de 1 μ L/min. Os animais passaram a apresentar crises convulsivas sustentadas em torno de 20 e 50 min após a administração de PILO, sendo estas crises registradas segundo os critérios da escala de Racine, os quais foram: 1) movimentos faciais e da boca; 2) balanço da cabeça; 3) clonia das patas anteriores; 4) elevação; 5) elevação e queda (Racine *et al.*, 1972). O SE foi interrompido 2 horas após o seu início por injeção intraperitoneal de 5 mg/kg de diazepam (Roche, Brasil). Nos dias subsequentes, os animais foram acompanhados em relação ao seu comportamento. Aqueles animais com maior debilidade foram hidratados e alimentados, individualmente, com ração umedecida e banana até a completa recuperação. No dia seguinte (pós-SE), os animais foram filmados 8 horas diárias, 7 dias da semana, para registro de crises recorrentes espontâneas (CREs) durante um

período de 72 ou 73 dias. As variáveis registradas foram latência para o início das CREs, duração, gravidade e número total de CREs. Para classificação das crises foi utilizada a escala de Racine (Racine *et al.*, 1972).

4.4.2 Modelo animal de esquizofrenia

Como um derivado da fenilciclidina, a QUET age como antagonista não competitivo de receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) e é capaz de induzir sintomas positivos, negativos, e déficits cognitivos similares aos encontrados na esquizofrenia (Keilhoff *et al.*, 2004a). Os efeitos psicomiméticos da QUET são transitórios, reversíveis e influenciados pelo tempo, dose e condições de administração (Keilhoff *et al.*, 2004a). A QUET administrada por via i.p tem sido reportada ter uma meia-vida de 5.4-5 horas e não significativamente se acumula no cérebro (Keilhoff *et al.*, 2004b). Doses sub-anestésicas induzem sintomas semelhantes a esquizofrenia devido ao antagonismo do receptor de NMDA. A droga pode bloquear o complexo receptor de NMDA o que poderia justificar a hipótese da deficiência de glutamato na esquizofrenia (Keilhoff *et al.*, 2004a).

Os animais foram injetados com dose diárias de QUET por 5 dias consecutivos (30 mg/kg, intraperitoneal, Ketamin S+ 50mg/mL Cristália, Brasil) no volume de 1 mL/100g do peso do rato, enquanto animais do grupo controle receberam SAL (0,9% p/v) no respectivo tempo de 5 dias consecutivos (Keilhoff *et al.*, 2004a).

4.4.3 Modelo animal de comorbidade

Como o modelo animal de epilepsia e psicose comórbida ainda não é definido, resolvemos unir os modelos de epilepsia e quetamina, com o propósito de analisar os parâmetros neuropatológicos e comportamentais dos animais.

De acordo com o esquema experimental, no dia zero, os animais receberam injeção ipsilateral de PILO 8 mg/kg (2,4 mg/ μ L diluída em salina 0,9%) para a indução do *status epilepticus* (SE). A PILO foi injetada manualmente na velocidade de 1 μ L/min. Os animais passaram a apresentar crises convulsivas sustentadas em torno de 20 e 50 min após a administração de PILO, sendo estas crises registradas segundo os critérios da escala de Racine (Racine *et al.*, 1972).

No 32º dia os animais foram injetados com dose diárias de QUET por 5 dias consecutivos (30 mg/kg, intraperitoneal, Ketamin 50mg/ml Cristália, Brasil) no volume de 1 mL/100g do peso do rato (Keilhoff *et al.*, 2004a). Passados 5 dias, no 37º dia os

animais foram injetados com NPS (2,5mg/kg intraperitoneal, Nitropruss 50mg pó liófilo da Cristália, Brasil) no volume de 0,1 mL/100g do peso do rato por 3 dias consecutivos.

Os efeitos do doador de óxido nítrico NPS foram estudados em ratos tratados com SAL, com SAL e QUET, com PILO e SAL e tratados com PILO e QUET. Seguida a administração do NPS mudanças comportamentais foram avaliadas.

4.5 Protocolos de testes realizados nos modelos animais de esquizofrenia e epilepsia

4.5.1. Atividade locomotora

O aparato consistiu em uma arena quadrada (46 x 46 cm) com piso branco delimitada por paredes transparentes (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Sensores de movimento infravermelho registraram a locomoção (distância e velocidade média) e atividades não-ambulatorias (levantamento: movimento ascendente ou com dianteiras em contato com a parede ou independente). Os valores foram calculados em blocos de 4 min ou no tempo total de registro de 20 min através do software Open Source 6.01 (Insight, Ltda) A velocidade também foi medida e produziu resultados semelhantes (dados não mostrados) como aqueles para a distância. A arena foi limpa com água após cada animal ser submetido ao teste. Mudanças nos padrões de locomoção em campo aberto, como hiperatividade (aumento da atividade vertical e horizontal) são comumente interpretadas como comportamentos psicóticos (Schiorring, 1979). Medidas de comportamento de ansiedade incluem a proporção relativa de trajetória usada para explorar os quadrantes do centro, em relação aqueles localizados adjacentes às paredes da arena (Bath et al., 2012). A arena de campo aberto foi dividida por linhas pretas em 64 quadrados de $5,75 \times 5,75$ cm. Os 16 quadrados centrais foram definidos como zona central e os 48 quadrados laterais como zona de borda. A proporção de tempo gasto nas bordas e centro do campo aberto foram estimados pelo programa Image J baseado no perfil de trajetória de cada animal. Os sintomas de ansiedade são uma característica central da esquizofrenia desde sua caracterização (Tandon *et al.*, 2009). Os ratos foram colocados inicialmente no centro da arena e testados apenas uma vez na tarefa de campo aberto.

Figura 6. A) Arena convencional para avaliação da atividade locomotora. B) Quantificação da atividade locomotora de um rato que recebeu injeção de Pilocarpina (2,4mg/μl) e Quetamina (30mg/kg) pelo programa *Open Source* 6.1 (Insight, Brasil) C- Proporção de tempo gasto nas bordas e no centro baseado no perfil de trajetória de cada animal estimado pelo programa *Image J*.

4.5.2 Teste de inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI)

Após o teste de locomoção da arena, os filtros sensório-motor dos ratos foram testado através do teste de inibição de sobressalto acústico por pré-pulso sonoro (ou PPI, do inglês *pre-pulse inhibition*), aplicado através de um aparato constituído por uma gaiola-estabilímetro localizada dentro de uma caixa ventilada com isolamento acústico (63 x 49 x 53 cm, Insight Ltda). O estabilímetro mede a amplitude do sobressalto, elicitado por estímulos sonoros de grande intensidade. O sobressalto dos animais em reação aos estímulos acústicos gera pressões no estabilímetro que são amplificadas, digitalizadas e pré-analisadas através de uma interface entre o equipamento e um software. Este software também controla todos os parâmetros de cada sessão do teste, com a intensidade dos estímulos acústicos e suas durações. Os estímulos sonoros (ruído mascarador de fundo, pré-pulso e pulso) foram gerados por dois autofalantes localizados dentro da caixa de isolamento acústico.

Imediatamente após o teste de monitoramento de exploração na arena de campo aberto, os animais foram colocados dentro da gaiola-estabilímetro para sessão de teste de PPI. A sessão foi iniciada com um período de habituação de 5 minutos, com ruído branco de fundo (68 dB) mantido ao longo de toda sessão. Após a habituação, um pulso sonoro intenso (120 dB, 30 ms) foi apresentado de modo a testar a elicitação basal do sobressalto e repetido na última sessão do teste. Em seguida, 10 blocos de 10 práticas foram apresentados para a medição da inibição do sobressalto pelo pré-pulso sonoro. Cada bloco incluiu quatro tipos de práticas: sem estímulo (ruído branco de fundo), pré-

pulso sozinho, pré-pulso seguido de pulso e pulso sozinho. O pré-pulso foi um tom puro (3000 Hz, 20 ms) com intensidade de 72,76, 80 ou 84 dB e o intervalo entre os estímulos (pré-pulso e pulso) foi de 100 ms. As práticas foram apresentadas em ordem randomizada dentro de cada bloco, com intervalo entre as práticas de $15 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$.

A porcentagem da habituação foi utilizada como parâmetro de aprendizagem e calculada como a redução na magnitude de sobressalto medida no primeiro e último bloco da sessão: $\% \text{ HAB} = 100 - [(100 \times \text{HAB}_2 / \text{HAB}_1)]$. A porcentagem de inibição do sobressalto causada pelo pré-pulso foi usada na busca por eventuais alterações no filtro sensorio-motor, como teste para a detecção de alterações comportamentais: $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$

A inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto está reduzida em animais de laboratório sob efeito de drogas psicotomiméticas, quando o pré-pulso perde a capacidade de inibir a resposta do sobressalto causada pelo pulso (Geyer *et al.*, 2001). Isto indica incapacidade do animal prestar atenção ao pré-pulso, pelo comprometimento do circuito córtico-estriado-pálido-pontino, responsável pela filtragem da informação sensorial ou cognitiva (Geyer *et al.*, 2001).

Figura 7. A) Caixa de isolamento acústico com gaiola de contenção para rato. Na base da gaiola, um estabilímetro detecta o reflexo do sobressalto do animal quando o estímulo acústico é gerado (pré-pulso e pulso) no modelo de inibição pré-pulso. B) Porcentagem da inibição pré-pulso em ratos que receberam uma droga psicotomimética, quetamina (1-10 mg/kg), 15 min antes do teste. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado aos animais que receberam salina (Imagem ilustrativa obtida em: http://www.inecusp.org/cursos/cursoV/modelos_animais.htm).

4.5.3 Teste de reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objeto baseia-se numa característica de roedores que tendem a gastar mais tempo explorando um objeto novo do que um objeto familiar.

Esse comportamento típico permite a análise da memória declarativa em roedores (Cavoy *et al.*, 1988). Após o término da tarefa de labirinto, os animais foram habituados (20min) à uma caixa de madeira com 46 cm diâmetro e 24 cm de largura para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Após 24 horas da habituação o animal foi colocado na caixa, com 2 objetos idênticos: A e A (cubos mágicos) para livre exploração por 5 minutos. Os objetos foram fixados nos cantos direito e esquerdo com fitas adesivas e sempre limpos com álcool 30° a cada teste. Para o comportamento exploratório foi definido como cheirar ou tocar os objetos com o focinho e patas anteriores. O paradigma experimental consistiu em uma fase de aquisição (treino) e teste propriamente dito, separados por um intervalo de 30 minutos. Nesse caso, após o intervalo de descanso o animal foi recolocado na caixa com o objeto familiar A e um objeto novo B (tubo) com o tempo de 5 minutos para explorar o ambiente. No dia seguinte, após 24 horas do teste, o animal foi recolocado na caixa com o mesmo objeto familiar A e outro objeto distinto C (cone) com o tempo de 5 minutos para explorar novamente o ambiente. O tempo gasto explorando cada objeto (familiar ou novo) foi registrado em vídeo e quantificado manualmente. O índice de reconhecimento foi calculado como porcentagem do tempo de exploração do objeto novo em relação ao tempo total de exploração a ambos os objetos. Esse índice foi utilizado para comparação entre grupos experimentais.

Figura 8. Esquema do protocolo de reconhecimento de objeto.

4.5.4 Memória espacial de trabalho (labirinto radial de oito braços)

O teste do labirinto radial de oito braços foi utilizado para avaliar memória espacial de trabalho relacionado a aspectos cognitivos e capacidade de aprendizado do animal. Para isso foi utilizado um labirinto radial composto por uma arena central

octogonal (30 cm de diâmetro) que dá origem a oito braços transparentes idênticos e simétricos (60 x 12 x 13 cm) elevados a 70 cm do chão. A arena é separada dos braços por portas de abertura superior automatizadas conforme um controle via interface com um software (Insight Ltda). Nas extremidades de cada braço há uma depressão circular no assoalho, medindo aproximadamente 3 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade, servindo como repositório de pedaços de ração, manualmente disponibilizadas em quatro braços no treino e em todos os braços no teste antes do início de cada sessão. A profundidade desses repositórios é suficiente para que os animais não enxerguem os pedaços antes de chegarem ao terço final do braço (Figura 7). No início de cada sessão, os ratos foram colocados no centro da arena octogonal, e o desempenho ótimo da tarefa consistiu em visitar cada um dos oito braços somente uma vez numa dada sessão. Assim, revisitas foram contabilizadas como erros. O tempo limite para cada sessão de treino e teste foi de 8 min e todos os braços foram limpos com água entre as sessões. Os animais passaram por um período de adaptação ao labirinto e por estratégia de restrição alimentar. A restrição alimentar consistiu numa oferta diária da ração de 30 a 40 g para cada rato, de modo a manter 85-90% de seus pesos adultos, com o monitoramento diário até o final dos experimentos. Tal restrição é um modelo padrão em procedimentos de aprendizagem por reforço positivo, de modo que pedaços da ração servem como recompensadores na tarefa espacial no labirinto radial de oito braços (Olton & Samuelson, 1976).

A habituação deu-se em sessão diárias de 10 minutos durante 5 dias, seguido de treino e teste propriamente dito (21 sessões diárias). Durante o treino e teste o animal deve ser capaz de achar o pedaço da ração através de localização espacial - dicas espaciais (imagens geométricas) fixadas na parede da sala. Foram feitos registros do tempo inicial de entrada no primeiro braço, braços visitados, braços retornados e tempo final para atingir o último braço. O tempo limite para cada sessão de treino e teste foi de 8 minutos e todos os braços higienizado com água na permanência ou na troca de rato. Não houve parâmetro para exclusão de animais: medo ou cautela para entrar nos braços e/ou a não adaptação a comer a ração. Todos os roedores foram mantidos até o final de 21 sessões. O protocolo de treinamento consistiu em um único treino por dia, com comida em quatro braços fixos (1, 2, 4 e 6), seguido de um teste por dia com comida nos oito braços, nesse caso foram considerados braços fixos 3, 5, 7 e 8. O intervalo de tempo entre treino e teste foi pré-estabelecido: (1) número de erros igual ou superior a 2 o animal permanece em descanso na caixa por 5 minutos; (2) erro igual ou menor a 1

por 2 dias consecutivos o animal permanece na caixa por 30 minutos. Durante todo o experimento, o labirinto foi mantido em uma posição constante, assim como todos os objetos da sala experimental e desenhos poligonais coloridos afixados na parede ao redor da sala.

Figura 9. Labirinto radial de 8 braços (Laboratório de Investigação em Epilepsia).

4.6 Processamento do tecido cerebral

No sétimo dia, após os testes comportamentais, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg i.p.). A perfusão foi realizada via intra-cardíaca. Com o auxílio de uma agulha foi puncionado o ventrículo esquerdo do animal, em seguida foi realizada uma incisão no átrio direito que permitiu a saída dos líquidos. Após a incisão no átrio direito foi infundida uma solução salina tamponada 0,9% no volume de 100 mL. A seguir uma solução de sulfeto de sódio 0,1% (150 a 200 mL) em salina tamponada foi infundida, seguida por paraformaldeído tamponado 4% (150 a 200 mL). Após a perfusão o cérebro foi removido da caixa óssea, com o auxílio de uma goiva, e colocado em solução de paraformaldeído tamponado a 4% por 4 horas. A seguir os cérebros foram desidratados. A desidratação visa à extração

de água e sua substituição por um solvente orgânico adequado e posterior inclusão em parafina.

O tecido foi sucessivamente colocado em uma série de soluções com concentrações crescentes de álcool iniciando com álcool 70% até álcool absoluto. Após esse passo o tecido foi diafanizado em xilol e incluído em parafina. Os blocos em parafina foram cortados de forma seriada em fatias de 8 µm de espessura, sendo as fatias montadas em lâminas gelatinizadas. Após a secagem as lâminas foram escorridas em estufa a 60°C por duas horas e armazenadas para posterior realização da imuno-histoquímica de nNOS. Este protocolo já foi padronizado pelo Laboratório de Investigação em Epilepsia – HC, FMRP/USP.

4.7 Método Histoquímico de Hematoxilina e Eosina

As secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcoois até água corrente. A seguir foram colocadas na solução de Hematoxilina de Harris (Laborclin) por cerca de um minuto e lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução diferenciadora de álcool ácido (99 mL de álcool 70 % e 0,5 mL de ácido clorídrico) e a seguir colocadas em solução de água e amônia (1 gota de NH₃ para cada 50 mL de água) até que atingissem o tom roxo-azulado desejado. Posteriormente, as secções foram lavadas imersas em etanol 70 %, seguido de etanol 95 %, e finalmente solução de Eosina-Floxina (50 ml de Eosina Amarelada Inlab 1 % em água, 5 mL de Floxina B Sigma 1 % em água, 380 mL de álcool comercial e 2 mL de ácido acético glacial). As secções então seguiram para desidratação, clarificação e montagem em Krystalon (Harleco).

4.8 Imuno-histoquímica

A primeira etapa da imuno-histoquímica foi a desparafinização: as lâminas foram incubadas em estufa histológica a 58°C por 10 minutos em jarro coplin. Em seguida, colocamos as lâminas em xilol e depois em uma solução de xilol-etanol absoluto, e em concentrações decrescentes de etanol até água. O passo seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena, com incubação das secções em 4,5% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS¹ por 20 minutos. Depois partimos para a

¹PBS: tampão fosfato salina = 50 mM Na₂HPO₄ (Vetec) pH 7,4 contendo 0,9% (p/v) NaCl (Quimex).

recuperação antigênica em micro-ondas com uso de tampões específicos. Depois realizamos o bloqueio dos sítios proteicos inespecíficos incubando as lâminas em tampão de bloqueio [tampão B² contendo 5% (p/v) leite em pó desnatado Molico e 10% (v/v) soro de cabra (Vector)] por 4-5 horas em temperatura ambiente. Em seguida realizamos a incubação com o anticorpo primário anti-mouse para nNOS³ por aproximadamente 16 horas. Em lâminas controle omitimos o anticorpo primário. A incubação com o anticorpo secundário anti-mouse⁴ ocorreu por uma hora, à temperatura ambiente. As secções passaram por outra lavagem com tampão B, para retirar o excesso de anticorpo não ligado ao tecido, e com tampão PBS por duas vezes de 5 minutos. Depois disso foi realizada a incubação com o kit Elite ABC (Vector). A biotina do kit é acoplada com peroxidase, molécula que ficará exposta à revelação conseguinte. Para isso, descongelamos um eppendorf de 1 mL de diaminobenzidina (DAB, Sigma) 10 mg/mL e misturamos a 24 mL de tampão Tris-HCl pH 7,6 e 8 µL de H₂O₂ a 30% (v/v). Após a revelação, as lâminas foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol, e posteriormente xilol e em seguida realizamos a montagem com lamínula e Kristalon (Harleco).

4.8.1 Anticorpo

O seguinte anticorpo foi utilizado no experimento de imuno-histoquímica: anti-nNOS (610309, BD Transduction Laboratories; diluído a 1:50 em tampão bloqueio).

4.9 Forma de Análise dos Resultados

4.9.1 Análises comportamentais

Todos os animais submetidos ao SE foram analisados quanto à latência para início e severidade das crises epiléticas. Assim como os animais submetidos aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (indução de QUET), bem como os animais injetados com doador de óxido nítrico (NPS). Todos os animais com sobrevivência de 70 dias foram filmados para o registro das CREs e análise comportamental. A filmagem foi realizada 8 horas por dia, 7 dias da semana, a partir do primeiro dia da injeção após o último insulto até o dia do sacrifício do animal. As variáveis registradas foram latência para o início das CREs, duração gravidade e número total das CREs

²Tampão B: Preparado a partir de tampão A (20 mM Na₂HPO₄, 450 mM NaCl pH 7,4) por adição de 0,3% (v/v) de Triton X-100 (Vetec).

³nNOS: mouse anti-nNOS (BD Bioscience), 610309, diluído a 1:50 com *blocking buffer*.

⁴Biotinylated swine anti-mouse IgG (Dako E0354), diluído a 1:200 com *blocking buffer*.

segundo a escala de Racine (1972), e análise do animal com relação aos sintomas da esquizofrenia.

4.9.2 Contagem neuronal em secções coradas por Hematoxilina e Eosina

A contagem foi realizada com auxílio do programa Image J versão 1.42q, seguindo o seguinte procedimento: foram feitos 5 quadrados de 100 x 100 µm para cada região, sendo os quadrados distribuídos pela foto de forma aleatória. Foi aplicado o fator de correção de Abercrombie para espessura do corte, permitindo-se definir a densidade neuronal, com os valores apresentados em milhares de células por milímetro cúbico. O fator de correção de Abercrombie inclui a seguinte fórmula: $n^{\circ} \text{ células/mm}^3 = (\text{contagem celular}) \times (\text{fator de Abercrombie}) / (\text{área total}) \times (\text{espessura do corte})$. Onde, contagem celular: corresponde ao número absoluto de células contadas em cada subcampo. Fator de Abercrombie: Para sua obtenção é considerado o diâmetro da célula e a espessura do corte, sendo 8 micrômetros para as células granulares e 14,3 micrômetros para as células piramidais do hipocampo, na espessura de corte de 8 micrômetros. Área total: área correspondente ao número de quadrados contados. As regiões analisadas foram: hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, tálamo da linha média, córtex pré-frontal e *nucleus accumbens*.

4.9.3 Análise estatística

Para comparar dados categóricos entre os grupos serão utilizados o Teste Exato de Fischer ou Teste do χ^2 (Chi-Quadrado). Para as variáveis contínuas foram utilizados os testes de Kolgomorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das amostras. Variáveis contínuas normalmente distribuídas foram analisadas com teste t de Student, ANOVA e correlação linear de Pearson (para quantificação da relação entre duas variáveis contínuas). Os correspondentes destes testes para variáveis não-normais foram os testes U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e correlação de Spearman, respectivamente. Em todos os testes foram fixado em 0,05 ou 5% ($\alpha < 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade. Foram utilizados os programas *GraphPad InStat* versão 3.01 e *SPSS* versão 11.0.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil dos animais injetados com PILO

A Tabela 1 descreve as CREs em 78 animais que completaram o paradigma experimental de indução de SE e posteriormente separados em grupos: PILO+SAL (n=16), PILO+QUET (n=17), PILO+SAL+NPS (n=22) e PILO+QUET+NPS (n=23). A tabela apresenta todos os ratos que foram injetados com PILO, inclusive ratos que apresentaram crises após a injeção e morreram ao longo dos experimentos (sigla †). São apresentadas a severidade das CREs, cuja filmagem permitiu a classificação comportamental de acordo com a escala de Racine modificada (Racine *et al.*, 1972).

Utilizando o modelo de injeção intrahipocampal da PILO os animais entraram em SE e permaneceram nele por 2 horas (latência) e alcançaram a escala Racine 4 ou 5. Em termos comportamentais, 42% das CREs corresponderam às escalas de Racine 1 e 2, 21% à escala 3, 19% à escala 4 e 18% à escala 5. A média e desvio padrão para ocorrência da primeira CRE foi de 26 dias $\pm$ 5, e a média do total de crises foi de 7,9 crises $\pm$ 3 em 71 dias. A Figura 10 mostra a frequência de crises, dia médio da primeira crise e frequência por tipo de crise, por grupo. Os animais do grupo epilepsia com psicose comórbida tratados com NPS (PILO+QUET+NPS) exibiram menor frequência de crises que o grupo não tratado (PILO+QUET).

Tabela 1. Descrição do perfil de crises de cada animal injetado com PILO.

	Grupo	Severidade RACINE					1ª CREs em dias	Total da CREs em até 71 dias
		R1	R2	R3	R4	R5		
Rato 179	PILO+SAL	x	x	x	x		6	6
Rato 182	PILO+SAL	x	x	x	x		43	3
Rato 183	PILO+SAL	x	x	x	x	x	30	5
Rato 186	PILO+SAL	x	x	x	x		32	6
Rato 187	PILO+SAL	x	x	x	x		3	5
Rato 188	PILO+SAL	x	x	x	x		23	15
Rato 189	PILO+SAL	x	x	x	x		28	4
Rato 190	PILO+SAL	x	x	x	x		39	5
Rato 191	PILO+SAL	x	x	x	x		2	7
Rato 192	PILO+SAL	x	x	x	x		6	16
Rato 193	PILO+SAL	x	x	x	x	x	1	1
Rato 194	PILO+SAL	x	x	x	x		9	5
Rato 195	PILO+SAL	x	x	x	x	x	25	13
Rato 197	PILO+SAL	x	x	x	x		†	

Rato 198	PILO+SAL	x	x	x	x		†	
Rato199	PILO+SAL	x	x	x	x		†	
Rato 71	PILO+SAL	x	x	x	x	x	15	33
Rato 72	PILO+QUET	x	x	x	x	x	56	
Rato 73	PILO+QUET	x	x	x			35	13
Rato 75	PILO+QUET	x	x	x	x		7	23
Rato 76	PILO+QUET	x	x	x	x		3	29
Rato109	PILO+QUET	x	x	x	x		48	6
Rato110	PILO+QUET	x	x	x	x	x	35	7
Rato 111	PILO+QUET	x	x	x	x		39	6
Rato 112	PILO+QUET	x	x	x	x		26	8
Rato 122	PILO+QUET	x	x	x			3	10
Rato 133	PILO+QUET	x	x	x	x		30	9
Rato 135	PILO+QUET	x	x	x	x	x	†	
Rato 150	PILO+QUET	x	x	x	x		19	6
Rato 151	PILO+QUET	x	x	x	x		21	6
Rato 152	PILO+QUET	x	x	x	x		19	12
Rato 153	PILO+QUET	x	x	x	x		44	5
Rato 154	PILO+QUET	x	x	x	x	x	47	6
Rato 200	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x	x	42	12
Rato 201	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x	x	10	13
Rato 202	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		28	3
Rato 203	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x	x	42	4
Rato 204	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x	x	55	1
Rato 216	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		22	
Rato 217	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		8	7
Rato 218	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 219	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		6	24
Rato 220	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 221	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 222	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		24	4
Rato 223	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		20	5
Rato 224	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		13	5
Rato 225	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		24	7
Rato 226	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		55	2
Rato 227	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		45	20
Rato 228	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		35	6
Rato 234	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		30	5
Rato 244	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 242	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		44	8
Rato 241	PILO+SAL+NPS	x	x	x	x		24	7
Rato 205	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 206	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	†	
Rato 207	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 208	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		38	3
Rato 209	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		7	3

Rato 210	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		57	1
Rato 211	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	33	3
Rato 212	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	†	
Rato 213	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	36	4
Rato 214	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	25	
Rato 215	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		10	7
Rato 229	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		45	3
Rato 230	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		35	4
Rato231	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 232	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		13	9
Rato 233	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 234	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		9	7
Rato 235	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 236	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		†	
Rato 237	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x	x	64	2
Rato 238	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		49	8
Rato 239	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		7	5
Rato 240	PILO+QUET+NPS	x	x	x	x		18	8

† Animais que morreram ao longo dos experimentos.

Figura 8. Crises espontâneas recorrentes (CREs). O número total de crises foi maior nos animais PILO+QUET quando comparado aos animais PILO+QUET tratados com NPS (PILO+QUET+NPS), embora sem diferença significativa na frequência de crises de maior severidade. *: $p < 0,02$; $t = 0,058$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.2 Testes comportamentais

A Tabela 2 contabiliza os 173 ratos selecionados para o protocolo experimental, dos quais 143 (82,65%) concluíram todos os testes e 30 (17,35%) morreram ao longo dos experimentos. Foram avaliadas a atividade locomotora e a inibição do pré-pulso de sobressalto em três momentos de testes comportamentais (I, II e III), além da memória de curta e longa duração somente no comportamento III.

Tabela 2. Número de ratos utilizados no protocolo experimental

	Comportamento I	Comportamento II	Comportamento III	Mortes
SAL+SAL (n=26)	23	23	21	5
SAL+QUET (n=16)	16	16	16	0
PILO+SAL (n=19)	16	16	16	3
PILO+QUET (n=21)	20	20	17	4
SAL+SAL+NPS (n=20)	20	19	15	5
SAL+KET+NPS (n=26)	25	23	22	4
PILO+SAL+NPS (n=22)	20	20	18	4
PILO+KET+NPS (n=23)	20	18	18	5

5.2.1 Atividade locomotora I

O grupo PILO apresentou maior taxa de exploração no teste de campo aberto, de acordo com a quantificação da distância percorrida em blocos, sendo estatisticamente diferente em todos os blocos de tempo ($849,51 \pm 77,08$ cm, $p < 0,001$). Assim como permaneceu mais tempo no centro da arena ($23,04 \pm 1,54\%$, $p < 0,001$) e também sobre as patas traseiras ($39,06 \pm 4,04$, $p = 0,002$) (Figura 11).

Figura 9. Campo aberto I. A distância percorrida (A), a proporção da trajetória no centro da arena (B) e o número de vezes em pé (C) foram significativamente maiores nos animais com epilepsia que nos animais controle. ** e ϕ : $p < 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.2.2 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) I

O grupo PILO apresentou uma redução na resposta do PPI em todas as intensidades de pré-pulso (72dB: $14,43 \pm 5,11$; 76dB: $19,78 \pm 3,34$; 80dB: $27,53 \pm 4,27$; 84dB: $38,02 \pm 3,38$, $p < 0,005$) o que sugere prejuízo no filtro sensorio motor desses animais. Em contrapartida não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo PILO e o grupo controle no sobressalto (Figura 12).

Figura 10. Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto I. A amplitude do reflexo de sobressalto (A) não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,889$). Na inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto com diferentes intensidades do pré-pulso (B), o grupo com epilepsia (PILO) apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo controle (SAL). **: $p \leq 0,005$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.3 Testes comportamentais

5.3.1. Atividade locomotora II

Os grupos SAL+QUET (14,14 % $\pm$ 1,92), PILO+SAL (23,44 % $\pm$ 2,83) e PILO+QUET (26,26 % $\pm$ 3,87) apresentaram maior porcentagem da trajetória no centro da arena quando comparado ao grupo controle (4,61 % $\pm$ 1,36, $p \leq 0,001$) (Figura 13, A,B,C). Os animais SAL+QUET elevaram-se mais sobre as patas traseiras do que os outros grupos ($42,88 \pm 5,90$, $p = < 0,001$); em contrapartida os animais tratados com PILO+QUET+NPS elevaram-se menos sobre as patas traseiras ($7,29 \pm 1,38$, $p = 0,001$) (Figura 13, D,E,F). O grupo SAL+QUET (8655,37 $\pm$ 612,44 cm, $p < 0,001$) apresentou hiperlocomoção em relação a todos os grupos, exceto PILO+QUET (Figura 13, G,H,I). O grupo PILO+SAL (1926,24 $\pm$ 269,85 cm, $p = < 0,001$) apresentou maior taxa de exploração em relação ao grupo controle. Por sua vez, o tratamento com NPS diminuiu a locomoção nos grupos PILO+SAL+NPS (2042,34 $\pm$ 494,11, $p = < 0,001$) e PILO+QUET+NPS (618,72 $\pm$ 165,69, $p = < 0,001$). Digno de nota, o tratamento com NPS sozinho (SAL+SAL+NPS) não diferiu do grupo controle (SAL+SAL).

Figura 11. Campo aberto II. Todos os grupos permaneceram mais tempo no centro da arena (A,B,C) em relação ao grupo controle (SAL+SAL), exceto o correlato comportamental de psicose tratado com NPS em relação ao grupo SAL+QUET. Animais SAL+QUET permaneceram maior número de vezes em pé (D,E,F) em relação a todos os demais grupos e o número de elevações foi abolido nos grupos tratados com NPS (PILO+QUET+NPS). Animais SAL+QUET exibiram hiperlocomoção (G,H,I) em relação a todos os demais grupos, exceto PILO+QUET. Animais com epilepsia (PILO+SAL) exibiram hiperlocomoção em relação ao grupo controle (SAL+SAL). A hiperlocomoção no grupo com epilepsia e

correlatos comportamentais de psicose (PILO+QUET) foi abolida com tratamento com NPS (PILO+QUET+NPS). &: SAL+SAL e SAL+QUET; α : SAL+QUET e PILO+SAL; β : SAL+QUET e PILO+QUET; ϕ : SAL+SAL e PILO+QUET; @: SAL+QUET e PILO+SAL; η : SAL+QUET e SAL+QUET+NPS; γ : SAL+QUET e SAL+SAL+NPS; $\$$: SAL+SAL e PILO+SAL; ϵ : SAL+SAL e PILO+SAL+NPS; #: PILO+QUET e PILO+QUET+NPS; ξ : SAL+SAL e PILO+QUET+NPS. ** e demais sinais: $p < 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.3.2. Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) II

O grupo PILO+QUET+NPS ($278,48 \pm 62,84$) apresentou resposta acústica reduzida de sobressalto comparado ao grupo PILO+QUET ($748,58 \pm 164,55$, $p = 0,021$) o que sugere que NPS interfere na discriminação de estímulos externos, melhorando prejuízos causados pela PILO e QUET no filtro sensorio motor (Figura 14, C). Todos os grupos apresentaram uma redução na resposta do PPI em relação ao controle (Figura 14, D,E,F). Também SAL+QUET apresentou redução no PPI na intensidade de 80dB quando comparado ao grupo SAL+SAL+NPS (Figura 14, E).

Figura 12. Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto II. O grupo epilepsia+psicose tratado com NPS (PILO+QUET+NPS) apresentou redução significativa na amplitude do reflexo de sobressalto (*, C), comparado ao grupo sem tratamento (PILO+QUET). Todos os grupos apresentaram uma redução significativa na inibição pré-pulso (D,E,F), comparados ao grupo controle (SAL+SAL). O grupo SAL+QUET apresentou uma redução significativa na inibição pré-pulso na intensidade de 80dB (E)

quando comparado ao grupo SAL+SAL+NPS. *:p < 0,01 e **:p ≤ 0,001. Valores apresentados como média ± erro padrão da média.

5.4 Testes comportamentais

5.4.1 Atividade locomotora III

Os animais PILO+SAL ($17,95 \pm 3,22$), PILO+QUET ($17,78 \pm 2,31$), PILO+SAL+NPS ($14,41 \pm 2,13$) e PILO+QUET+NPS ($14,29 \pm 2,54$) apresentaram maior porcentagem da trajetória no centro da arena quando comparado ao grupo controle ($4,36 \pm 0,87$, $p < 0,001$). Assim como PILO+QUET ($17,78 \pm 2,31$) em relação ao SAL+QUET ($7,44 \pm 1,85$, $p = < 0,001$) (Figura 15, A,B,C). O grupo PILO+QUET ($40,73 \pm 8,29$) se manteve maior número de vezes em pé do que o grupo controle ($21,08 \pm 1,91$, $p = 0,043$), enquanto o seu tratamento com NPS ($20,74 \pm 2,56$, $p < 0,001$) cessou as elevações (Figura 15, D,E,F). Os animais epilépticos com correlatos comportamentais de psicose (PILO+QUET) ($2383,98 \pm 407,85$, $p < 0,001$) exibiram maior atividade locomotora do que os demais grupos; em contrapartida o tratamento com NPS diminuiu a hiperlocomoção nos animais PILO+SAL+NPS ($3244,68 \pm 762,25$, $p < 0,001$) e PILO+QUET+NPS ($1214,21 \pm 134,62$, $p < 0,001$) (Figura 15, G,H,I).

Figura 13. Campo aberto III. Todos os grupos de animais com epilepsia exibiram maior trajetória no centro da arena (A,B,C) em relação aos controles, assim como o grupo PILO+QUET em relação ao grupo SAL+QUET (A). O grupo PILO+QUET teve mais levantamentos nas patas traseiras que os controles, e essas elevações foram abolidas com o tratamento com NPS (PILO+QUET+NPS) (F). Animais PILO+QUET exibiram hiperlocomção em relação aos demais grupos (G,H,I). A hiperlocomção no grupo com epilepsia e correlatos comportamentais de psicose (PILO+QUET) foi abolida com o tratamento com NPS (PILO+QUET+NPS). ϕ : SAL+SAL e PILO+QUET; β : SAL+QUET e PILO+QUET; $\$$: SAL+SAL e PILO+SAL; ϵ : SAL+SAL e PILO+SAL+NPS e #: PILO+QUET e PILO+QUET+NPS. ** e demais sinais: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.4.2 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) III

Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas para a resposta de sobressalto (Figura 16, A,B,C). O grupo PILO+SAL apresentou resposta reduzida para todas as intensidades do PPI em relação ao grupo controle de acordo com a Figura 16 (D, F), assim como na intensidade de 72dB em relação a SAL+QUET (Figura 16, D), o que sugere prejuízo no filtro sensorio motor dos animais com epilepsia.

Figura 14. Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto III. Não houve diferenças significativas na amplitude de reflexo do sobressalto para os grupos (A,B,C) ($p = 0,904$). O grupo epilético (PILO+SAL) apresentou uma redução em todas as intensidades de inibição pré-pulso comparado ao grupo controle (SAL+SAL) (D e F) e apenas na intensidade de 72dB com relação a SAL+QUET (D). O grupo PILO+SAL, PILO+SAL+NPS apresentaram redução na inibição pré-pulso em relação ao controle (SAL+SAL) (F). Também nas intensidades de 76dB e 80dB o grupo epilepsia+psicose tratado com NPS apresentou redução na inibição pré-pulso em relação ao controle, e em relação a PILO+QUET na intensidade de 76dB (F) **: $p \leq 0,002$; e *: $p < 0,02$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.5 Testes de memória

5.5.1 Reconhecimento de objeto

No teste de reconhecimento os animais PILO+SAL (índice do objeto novo $42,31 \pm 3,60$) e PILO+QUET (índice do objeto novo $46,45 \pm 2,51$) exploraram o objeto novo (Figura 17, A,C) por um tempo significativamente menor do que os animais controles ($58,65 \pm 2,41$, $p = 0,008$). Esse achado sugere que o grupo epiléptico e o grupo epiléptico com correlato comportamental de psicose não reconheceram o objeto como novo, sugerindo prejuízo na memória. O modelo animal de esquizofrenia (SAL+QUET) também apresentaram prejuízo de memória (t , $p = 0,07$) e o tratamento com NPS (t , $p = 0,052$) não reverteu de modo significativo este déficit (Figura 17, E,F).

Figura 15. Memória de reconhecimento de objeto. O grupo epiléptico (PILO+SAL) e o grupo PILO+QUET apresentaram menor tempo de exploração no objeto novo do que os animais controles (A e C). Na fase tardia do teste nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos, exceto uma tendência de SAL+QUET (E) e PILO+QUET+NPS (F) em relação ao grupo controle. A**: $p = 0,008$; C*: $p = 0,024$; E: $t = 0,07$; F: $t = 0,052$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.5.2 Labirinto radial de oito braços

O grupo PILO+SAL ($8,50 \pm 0,57\%$) e PILO+SAL+NPS ($8,44 \pm 0,68\%$) demoraram mais tempo para pegar o primeiro pellet no treino, e uma tendência (t) ($p = 0,056$) de PILO+QUET+NPS comparado ao grupo controle ($6,04 \pm 0,58\%$, $p = 0,013$). A Figura (18, A,C) mostra o índice de tempo para concluir esta etapa inicial da tarefa.

Figura 16. Tempo para tomada do 1º pellet em relação ao tempo total no treino e no teste (%). O índice de tempo para obter o 1º pellet no treino nos animais epiléticos (PILO+SAL) e nos tratados com NPS (PILO+SAL+NPS), e tendência do grupo PILO+QUET+NPS em relação aos animais controle (A, C). No teste não houve diferença significativa entre os grupos. *: $p < 0,02$ e $t = 0,056$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

No treino o grupo SAL+QUET ($151 \pm 10,64s$) apresentou prejuízo no tempo para execução da tarefa com relação ao grupo epilético PILO+SAL ($87 \pm 6,84s$, $p = 0,012$), porém PILO+SAL gastou menos tempo (s) para concluir a tarefa comparado ao grupo controle ($131 \pm 10,64s$, $p = 0,012$) (Figura 19, C), o que sugere comprometimento de memória para os animais que receberam PILO quando comparados àqueles que receberam QUET. Para o teste o grupo SAL+QUET ($185 \pm 10,18s$, $p = 0,002$) demorou mais tempo para recolher os 4 pellets que PILO+SAL ($140 \pm 8,78s$, $p = 0,007$), grupo controle ($137 \pm 6,86s$, $p = 0,007$) e àqueles tratados com NPS, no caso SAL+SAL+NPS ($133 \pm 8,86s$, $p = 0,002$) e SAL+QUET+NPS ($135 \pm 6,17s$, $p = 0,002$), o que sugere que NPS não teve efeito positivo no tempo para execução da tarefa completa.

Figure 17. Tempo total de tomada dos 4 pellets no treino e no teste. O tempo para obter os 4 pellets no treino foi maior nos animais controles do que no grupo epiléptico (PILO+SAL) (C). Enquanto o grupo SAL+QUET apresentou maior tempo para obter os 4 pellets no treino e no teste do que nos animais epiléticos (PILO+SAL) (A, E), e que nos controles no teste (E, D); foi também maior no teste em relação aos animais tratados com NPS (SAL+SAL+NPS e SAL+QUET+NPS) (D).*: $p = 0,03$; **: $p < 0,01$. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

A memória espacial de trabalho mostrou-se comprometida nos animais que receberam SAL+PILO (treino $32,88 \pm 5,28$ e teste $119,75 \pm 7,32$) e PILO+QUET (treino $33,69 \pm 5,24$ e teste $123,94 \pm 7,67$) uma vez que cometeram maior número de erros durante o treino e o teste. A Figura 20 mostra as curvas de aquisição referente ao número de erros (retornos a braços já visitados) ao longo de 21 dias teste. Em contrapartida o tratamento com NPS melhorou o desempenho dos animais SAL+QUET (treino $15,38 \pm 2,42$ e teste $66,25 \pm 3,90$) e não interferiu no prejuízo de memória dos animais SAL+PILO (treino $44,17 \pm 5,70$ e teste $128,22 \pm 8,18$).

Figura 18. Número de erros no treino e no teste no transcorrer dos dias. Em diversos momentos da curva de aprendizado, o número de erros foi significativamente maior nos animais com epilepsia e correlatos comportamentais de psicose (PILO+QUET) (A,C). Nos animais injetados com quetamina, o tratamento com NPS reverteu o prejuízo de memória de trabalho (E). O tratamento com NPS não teve efeito positivo na memória dos animais com epilepsia (F). Símbolos equivalem a diferenças entre os grupos ($p < 0,03$). ¢: SAL+SAL e PILO+QUET; γ: SAL+QUET e SAL+SAL+NPS; €: SAL+SAL e PILO+SAL+NPS; £: SAL+SAL e PILO+QUET+NPS; \$: SAL+SAL e PILO+SAL; @: SAL+QUET e PILO+SAL; α: SAL+QUET e PILO+SAL; β: SAL+QUET e PILO+QUET; §: SAL+SAL+NPS e SAL+QUET+NPS; η: SAL+QUET e SAL+QUET+NPS. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.6 Densidade Neuronal

Os resultados apresentados abaixo representam as análises de densidade neuronal nas seguintes regiões cerebrais: hipocampo (camada granular do hipocampo, hilo, CA1, CA2, CA3) córtex pré-límbico, córtex infra-límbico e córtex cingulado, *nucleus accumbens*, córtex entorrinal, amígdala, núcleo talâmico mediodorsal, núcleo talâmico ventromedial, córtex ectorrinal, *subiculum*, córtex perirrinal e *nucleus reuniens*.

A Figura 21 mostra perda neuronal significativa no grupo PILO+QUET ($p \leq 0,001$) na maior parte das regiões, exceto na amígdala, núcleo talâmico mediodorsal e

ventromedial. Assim como para o grupo PILO+SAL ($p \leq 0,001$) em relação ao grupo controle e SAL+QUET ($p \leq 0,001$) no hipocampo (CA1, CA2 e CA3), córtex pré-límbico, infra-límbico, entorrinal e *nucleus reuniens*. O grupo PILO+QUET evidenciou perda neuronal em grande parte das regiões.

Figura 19. Densidade neuronal em regiões cerebrais de ratos tratados com pilocarpina, quetamina e salina. Nas regiões de CA1, CA2, CA3 (A), PRL (B), ECT, SUB e RE (D) os grupos controle (barras brancas), SAL+QUET (barras vermelhas) e PILO+SAL (barras verdes) apresentaram maior densidade neuronal que o grupo PILO+QUET (barras azuis). Também em CA1, CA2, CA3 (A), PRL, IL (B), ECT e RE (D) os grupos controle e SAL+QUET apresentaram maior densidade neuronal do que PILO+SAL. Em CG, HILO (A) e PRH (D) o grupo controle apresentou maior densidade neuronal que PILO+QUET (barras azuis). Em IL e Cg1 (B) os grupos controle e SAL+QUET apresentaram maior densidade neuronal que PILO+QUET. Na região do ENT (C) o grupo controle apresentou maior densidade neuronal que PILO+SAL e PILO+QUET, enquanto SAL+QUET apresentou maior densidade neuronal que PILO+QUET **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

A Figura 22 mostra uma maior densidade neuronal no grupo SAL+SAL+NPS ($p \leq 0,001$) em relação ao grupo controle (córtex cingulado, *nucleus accumbens*, entorrinal e *subiculum*) e grupo SAL+QUET ($p \leq 0,001$) e SAL+QUET+NPS ($p \leq 0,001$) (*nucleus accumbens*, amígdala e *subiculum*). Além de diferenças significativas na região do entorrinal, córtex cingulado do grupo SAL+SAL+NPS ($p \leq 0,001$) em relação a SAL+QUET ($p \leq 0,001$). Todavia no córtex perirrinal o grupo SAL+QUET+NPS ($p \leq 0,001$) evidenciou diferença significativa em relação a SAL+QUET ($p \leq 0,001$). É

notável que o tratamento com NPS preservou a densidade neuronal comparado àqueles que receberam QUET e também os posteriormente tratados com o doador de óxido nítrico.

Figura 20. Densidade neuronal em regiões do sistema límbico de ratos controles tratados com quetamina e nitroprussiato. Na região da CG (A) e PRL (B) o grupo controle (barras brancas) apresentou maior densidade neuronal que o grupo SAL+SAL+NPS (barras amarelas). Enquanto em Cg1 e ACC (B), ENT (C) e SUB (D) o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior densidade neuronal do que o controle. Na região de ACC (B), AMG (C) e SUB (D) o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior densidade neuronal do que SAL+QUET (barras vermelhas) e SAL+QUET+NPS (barras laranjas). Nas regiões do ENT (C) e Cg1 (B) o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior densidade neuronal que o grupo SAL+QUET, assim como em CA3 (A) e em PRH (D) respectivamente os grupos controles e SAL+QUET+NPS apresentaram maior densidade neuronal que SAL+QUET **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

A Figura 23 mostra perda neuronal significativa para o grupo PILO+SAL, PILO+SAL+NPS, PILO+QUET e PILO+QUET+NPS (todos $p \leq 0,001$) em relação ao controle em várias regiões. Exceto na camada granular, córtex cingulado, *nucleus accumbens*, amígdala e córtex perirrinal, onde o grupo PILO+SAL não diferiu do grupo controle. Assim como na região do córtex cingulado e no *reuniens* sem diferenças de PILO+QUET e PILO+QUET+NPS em relação ao controle. Porém PILO+SAL ($p \leq 0,001$) apresentou maior densidade neuronal que o grupo controle na região do *subiculum*.

Figura 21. Densidade neuronal em regiões do sistema límbico de ratos tratados com pilocarpina, quetamina e nitroprussiato e grupo controle. Em praticamente todas as regiões analisadas o grupo controle (barras brancas) apresentou maior densidade neuronal que os grupos PILO+SAL (barras verdes escuras), PILO+SAL+NPS (barras verdes claras), PILO+QUET (barras azuis) e PILO+QUET+NPS (barras lilás). Na CG (A), Cg1, ACC (B), AMG (C), e PRH (D) o grupo controle não diferiu do grupo PILO+SAL. O grupo controle também não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos PILO+QUET no Cg1 (B) e PILO+QUET+NPS no RE (D). Por fim, no SUB, o grupo PILO+SAL apresentou maior densidade neuronal que o grupo controle. **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

De modo geral, observa-se que os grupos com epilepsia puro (PILO+SAL) e com correlato comportamental de psicose (PILO+QUET) evidenciam perdas neuronais significativas em quase todas as regiões cerebrais. O tratamento com NPS impediu este quadro apenas no *subiculum* e córtex entorrinal nos animais epiléticos com correlatos comportamentais de psicose. Nas Figuras 24 a 26 abaixo podemos observar exemplos de espécimens corados com hematoxilina-eosina e seus padrões neuropatológicos.

Figure 22. Fotomicrografia das secções (8 μ m) da região do hipocampo camada granular do GD, marcadas pela coloração de HE. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 μ m. Aumento de 20x.

Figura 23. Fotomicrografia das secções (8 µm) da região do hipocampo CA1, marcadas pela coloração de HE. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 µm. Aumento de 20x.

Figura 24. Fotomicrografia das secções (8 µm) da região infra-límbica marcadas pela coloração de HE. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 µm. Aumento de 20x.

5.7 Expressão de nNOS

A Figura 27 mostra significativo aumento da área imunorreativa para nNOS nos grupos PILO+SAL ($p \leq 0,001$) em relação aos controles, SAL+QUET e PILO+QUET para diferentes regiões (camada granular, CA2, CA3 entorrinal e núcleo talâmico mediodorsal). Em contrapartida PILO+QUET ($p = 0,001$) e SAL+QUET ($p = 0,001$) evidenciaram diferença significativa da área imunorreativa para nNOS em relação ao grupo controle na região do *nucleus accumbens* e do ectorrinal.

Figura 25. Área imunorreativa (A-IR) para nNOS em regiões límbicas de ratos tratados com pilocarpina e quetamina e grupo controle. Na região de CG os grupos PILO+SAL (barras verdes) e PILO+QUET (barras azuis) apresentaram maior A-IR para nNOS em relação aos grupos controle (barras brancas) e SAL+QUET (barras vermelhas) (A). Em CA2 os grupos PILO+SAL e controles apresentaram maior A-IR para nNOS que PILO+QUET (A). Nas regiões ENT e TDM somente o grupo PILO+SAL apresentou maior A-IR para nNOS em relação aos grupos controles e SAL+QUET (C); maior A-IR para nNOS que o grupo PILO+QUET (azul) em CA3 (A) e ENT (C). Em ACC (B) e ECT (D), respectivamente, os grupos PILO+QUET e SAL+QUET apresentaram maior A-IR para nNOS em relação ao grupo controle. **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

A Figura 28 mostra significativo aumento da área imunorreativa para nNOS nos grupos SAL+QUET+NPS em relação aos controles e SAL+QUET na região do hilo. Já na região núcleo talâmico médio dorsal evidenciou-se diferenças significativas da área

imunorreativa para nNOS para os grupos SAL+SAL+NPS e SAL+QUET+NPS e apenas SAL+SAL+NPS marcou positivamente no núcleo talâmico ventromedial. Também na região do córtex cingulado o grupo SAL+QUET+NPS apresentou maior área imunomarcada que SAL+SAL+NPS e também em relação ao grupo controle no *nucleus accumbens*. No ectorrinal os grupos SAL+QUET e SAL+QUET+NPS apresentaram maior área imunomarcada que o grupo controle e no córtex perirrinal o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior marcação para nNOS que o grupo controle.

Figura 26. Área imunorreativa (A-IR) para nNOS em regiões límbicas de ratos controles tratados com quetamina e nitroprussiato. Na região do hilo, o grupo SAL+QUET+NPS (barras laranjas) apresentou maior A-IR que os grupos controle (barras brancas) e SAL+QUET (barras vermelhas) (A). No TDM, os grupos SAL+SAL+NPS (barras amarelas) e SAL+QUET+NPS apresentaram maior A-IR para nNOS que o grupo controle e no VM apenas o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior A-IR para nNOS que o grupo controle (C). No Cg1 o grupo SAL+QUET+NPS apresentou maior A-IR que o grupo SAL+SAL+NPS e também com relação ao grupo controle no ACC (B). No ECT, os grupos SAL+QUET e SAL+QUET+NPS apresentaram maior A-IR para nNOS que o grupo controle e no PRH o grupo SAL+SAL+NPS apresentou maior A-IR para nNOS que o grupo controle (D). **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

A Figura 29 mostra que todos os grupos com epilepsia analisados apresentaram maior área imunorreativa para nNOS que o grupo controle em várias regiões (camada granular, *nucleus accumbens* e núcleo talâmico mediodorsal). Tanto o grupo PILO+SAL+NPS ($p \leq 0,001$) e PILO+QUET+NPS ($p \leq 0,001$) apresentam área imunorreativa positiva comparado ao grupo controle na região do hilo, entorrinal e

córtex perirrinal. No entorrinal e córtex perirrinal também PILO+SAL ($p \leq 0,001$) e PILO+QUET ($p \leq 0,001$) apresentou maior imunomarcção para nNOS do que os grupos controles. Os grupos controles e PILO+SAL ($p \leq 0,001$) apresentaram maior área imunomarcada para nNOS que PILO+SAL+NPS nas regiões de CA1 e CA2, enquanto no córtex pré-límbico e no núcleo talâmico médio dorsal, o grupo PILO+SAL+NPS ($p \leq 0,001$) apresentou maior área imunomarcada para nNOS que o controle e PILO+SAL ($p \leq 0,001$). Todavia PILO+SAL+NPS ($p \leq 0,001$) marcou positivamente apenas na região do *nucleus accumbens*, amígdala, ectorrinal e *reuniens* em relação ao PILO+SAL ($p \leq 0,001$). Já em CA2 e entorrinal o grupo PILO+QUET+NPS ($p \leq 0,001$) apresentou maior imunomarcção que PILO+QUET ($p \leq 0,001$), porém os controles marcaram mais que PILO+QUET.

Figura 27. Área imunorreativa (A-IR) marcada para nNOS em regiões límbicas de ratos tratados com pilocarpina, quetamina, nitroprussiato e grupo controle. Na região de CG (A), ACC (B), AMG e TDM (C) todos os grupos analisados apresentaram maior A-IR para nNOS que o grupo controle (barras brancas). No HILO (A), ENT (C) e PRH (D) os grupos PILO+SAL+NPS (barras verdes claras) e PILO+QUET+NPS (barras lilás) apresentaram maior A-IR para nNOS que o grupo controle, enquanto PILO+SAL e PILO+QUET apresentou maior A-IR para nNOS que os controles apenas em ENT (C) e PRH (D) respectivamente. Em CA1 e CA2 (A) os grupos controle e PILO+SAL (barras verdes escuras) apresentaram maior A-IR para nNOS que PILO+SAL+NPS, enquanto em PRL (B) e TVM (C), o grupo PILO+SAL+NPS apresentou maior A-IR para nNOS que o controle e PILO+SAL. Apenas nas regiões de ACC (B), AMG (C), ECT e RE (D) PILO+SAL+NPS foi maior que PILO+SAL. Em CA2 (A) e ENT (C) o grupo PILO+QUET+NPS apresentou maior A-IR para nNOS que PILO+QUET, porém o grupo controle apresentou maior A-IR que PILO+QUET. **: $p \leq 0,001$. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

Nas Figuras 30 a 32 abaixo podemos observar exemplos de espécimens imunomarcados para nNOS e seus padrões de expressão característicos.

Figura 28. Fotomicrografia das secções (8 μm) da região do hipocampo camada granular do GD, pela marcação de nNOS. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 μm. Aumento de 20x.

Figura 29. Fotomicrografia das secções (8 µm) da região do hipocampo CA1, pela marcação de nNOS. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 µm. Aumento de 20x.

Figura 30. Fotomicrografia das secções (8 µm) da região infra-límbica, pela marcação de nNOS. Todas as imagens foram adquiridas na mesma configuração microscópica. Barra no canto inferior direito equivale a 200 µm. Aumento de 20x.

6. DISCUSSÃO

Caracterizada por uma constelação de sinais e sintomas de caráter fortemente hereditário e associada a gatilhos ambientais, a esquizofrenia representa uma desordem específica, de pouco conhecimento neurobiológico, baseada principalmente na avaliação psiquiátrica (Modai & Shomron, 2016). A pesquisa experimental é chave para investigação da doença, e reproduzir o transtorno psiquiátrico em animais é um desafio não apenas para imitar a condição humana, mas esclarecer a gênese da doença (Dawe *et al.*, 2009). Em um estudo recente de nosso laboratório com o modelo agudo de esquizofrenia por injeção de QUET, verificamos que o tratamento com doador de NO NPS, mas não com azul de metileno (um inibidor de NO) foi eficiente na reversão de correlatos comportamentais de sintomas positivos, de humor e cognitivos (Kandratavicius *et al.*, 2014b). Em pacientes com esquizofrenia, Hallak e colaboradores (2013) mostraram que a infusão de NPS (0,5µg/kg/min por 4 horas) é capaz de melhorar sintomas positivos, negativos, de ansiedade e depressão. Além disso, um recente estudo piloto revelou que a infusão de NPS também promove a melhora de sintomas cognitivos (Maia-de-Oliveira *et al.*, 2014a), como verificamos em modelo animal (Kandratavicius *et al.*, 2014b). A base clínica para os benefícios do NPS pode ser o aumento das concentrações do segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e o seu efeito modulatório no receptor NMDA (Hallak *et al.*, 2013). Os doadores de NO também atuam no aprendizado e memória, no crescimento neuronal *in vitro*, além de serem eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Thatcher *et al.*, 2005). Os modelos animais são ferramentas inovadoras para estudos farmacológicos, anatômicos e comportamentais relacionados à doença. Através de desenhos experimentais é possível compreender mecanismos e aplicá-los a investigação translacional. O desafio de inserir os resultados da pesquisa básica à prática clínica é um desafio para a descoberta de alvos terapêuticos. Modelos animais representam uma alternativa interessante para a investigação de estratégias terapêuticas relacionadas a sintomas encontrados em humanos (Kandratavicius *et al.*, 2014b).

A disponibilidade de modelos farmacológicos consistentes na ELTM como o de PILO intrahipocampal tem ajudado a esclarecer sobre a epileptogênese e suas consequências neuropsiquiátricas. Como resultado, o uso apropriado de modelo de SE farmacológico torna-se essencial e resulta em crises crônicas parecidas com as da

ELTM. Como revisto por Kandratavicius e colaboradores (2014a) o uso de quimioconvulsivantes como a PILO e ácido caínico gera crises espontâneas em roedores semelhantes as crises epiléticas em humanos, injúria inicial precipitante, além de mudanças neuropatológicas e comportamentais.

O presente estudo colaborou na caracterização de um modelo de epilepsia e psicose comórbida com e sem tratamento com NPS ao comparar diferentes grupos: PILO+SAL, PILO+SAL+NPS, PILO+QUET, PILO+QUET+NPS em vários aspectos comportamentais (locomotoão livre, teste de inibião pré-pulso, reconhecimento de objeto e memória de trabalho), paralelamente ao monitoramento de crises quanto à escala de Racine (Racine *et al.*, 1972). Outra contribuião foi avaliar a perda neuronal e a expressão de nNOS nas seguintes regiões: hipocampo (camada granular do hipocampo, hilo, CA1, CA2, CA3) córtex pré-límbico, córtex infra-límbico e córtex cingulado, *nucleus accumbens*, córtex entorrinal, amígdala, núcleo talâmico mediodorsal, núcleo talâmico ventromedial, córtex ictorrinal, *subiculum*, córtex perirrinal e *nucleus reuniens*.

6.1 Perfil dos animais

Crises espontâneas são geradas em roedores através do uso de quimioconvulsivantes como a PILO e ácido caínico (Leite *et al.*, 2002b; Kandratavicius *et al.*, 2014a). Por sua vez os modelos animais replicam a história natural de epilepsia com características clínicas e neuropatológicas da epilepsia humana - danos no lobo temporal, prejuízo comportamental e cognitivo (Turski *et al.*, 1989; Leite *et al.*, 2002b; Kandratavicius *et al.*, 2014a). De acordo com Furtado e colaboradores (2002) um modelo animal apresenta um período latente após o insulto inicial, hiperexcitabilidade crônica e crises espontâneas. Portanto, reproduções de SE em modelos experimentais parecem satisfazer estes critérios. No modelo de SE induzido por microinjeção intrahipocampal de PILO os ratos parecem imitar aspectos comportamentais, morfológicos e eletroencefalográficos da ELT, porém com mortalidade inferior à dos protocolos de SE por injeção sistêmica de PILO (Furtado Mde *et al.*, 2002). Injeções sistêmicas ou intracerebral de PILO causam crises que se transformam em SE límbico. Danos estruturais e o desenvolvimento de CREs se assemelham às crises parciais complexas em humanos e podem ser encontradas várias similaridades neuroquímicas entre o modelo de PILO e a ELT humana: a) atividade interictal dentro do *subiculum*

para humanos e modelo animal; b) neurotrofinas regulados no hipocampo mesial e no neocórtex do modelo animal de epilepsia e c) déficits cognitivos e de memória em pacientes com ELT e ratos injetados com PILO (Kandratavicius *et al.*, 2014a). De acordo com Mello & Covolan (1996) o SE induzido por lítio-pilocarpina pode ser considerado um modelo multifocal de dano no cérebro envolvendo estruturas como hipocampo, amígdala, córtex parahipocampal, e tálamo. De acordo com os resultados os nossos ratos injetados com PILO intrahipocampal permaneceram em SE por 2 horas e atingiram alterações comportamentais avaliadas segundo a escala de Racine para os estágios 4 a 5 (Racine *et al.*, 1972). Na indução de SE por PILO intrahipocampal o período latente e a severidade da injúria podem variar de dias a meses nos modelos animais o que depende do método e da quantidade de crises monitoradas (Williams *et al.*, 2007). No nosso trabalho 78 ratos submetido ao SE atingiram a escala 4 e 5 de Racine (1972), com média da primeira CRE em 26 dias $\pm$ 5 (de 1 a 64 dias) e número total de crises de 7,9 crises $\pm$ 3 em 71 dias. Corroborando com os nossos resultados o estudo de Cejas e colaboradores (2014) mostrou que 73% dos ratos submetidos ao SE por PILO i.h alcançaram a escala 4 e 5 de Racine (1972), todavia cerca de 32,5% dos animais apresentaram CREs acima de 10 meses e o restante por volta de 4 meses após a indução do SE. Já Furtado e colaboradores (2011) mostraram que ratos submetidos ao SE por PILO i.h. apresentaram CREs no período de 2 a 30 dias e as crises também foram monitoradas por filmagem durante 8 horas por dia. Também no estudo de Cavalheiro e colaboradores (1991) ratos injetados com ácido caínico i.h. (0,8-2 μ g) apresentaram CREs entre 6 a 22 dias e outro resultado do mesmo grupo também comprovaram CREs entre 4 a 42 depois da indução do SE por PILO (Cavalheiro, 1995).

Comorbidades psiquiátricas são frequentes em pacientes com ELT e aspectos neurológicos e de conectividade parecem envolver o sistema límbico. A desregulação e danos entre estruturas anatômicas críticas, como hipocampo, amígdala, tálamo, e córtices temporal, frontal e cingulado parecem predispor o cérebro com ELT à psicose (Kandratavicius *et al.*, 2014d). O desenvolvimento de um modelo animal de psicose comórbida é inédito, o que torna o nosso estudo pioneiro na descoberta sobre as alterações neuroquímicas, neuroanatômicas e comportamentais do ponto de vista comportamental e neuropatológico comparado com modelos animais de epilepsia e esquizofrenia puros. Os nossos resultados revelaram que o grupo epilepsia com psicose comórbida tratados com NPS (PILO+QUET+NPS) exibiram menor frequência de crises que os grupos não tratados (PILO+QUET). Sugere-se um possível um efeito protetor

de NPS para as crises epiléticas. Corroborando com os nossos resultados o estudo de Marangoz e colaboradores (Marangoz *et al.*, 2012) sobre crises epiléticas induzidas por penicilina (200iU/1μL) em ratos tratados com acetilcolina (ACh) e NPS mostrou redução nos disparos neuronais de frequência para crises mesmo a ACh aumentando a atividade epileptiforme dentro 5 minutos após 30 minutos da administração de penicilina. Quando ACh e NPS foram administrados juntos, a frequência de disparos neuronais da atividade epileptiforme foi suprimida. Quando a ACh foi administrada sozinha, houve facilitação da atividade epileptiforme, e com NPS aumentou os efeitos anticonvulsivos. Os mecanismos de maior supressão ACh+NPS em atividade epileptiforme induzido por penicilina ainda não são conhecidos, mas podem ser explicados: 1º) ACh pode suprimir crises através da produção de NO através da coadministração de ACh e NPS que poderia aumentar a produção de NO como detectado em fatias de medula espinhal no estudo de Xu e colaboradores (Xu *et al.*, 1996). A liberação de vaso relaxantes de tecido de medula espinhal por acetilcolina resulta da ação de receptores muscarínicos, com efeito antinociceptivo e aumentada atividade simpatomimética consistente com o mecanismo do NO. Embora a localização anatômica da ação da ACh não seja conhecida, os resultados evidenciam que a ACh promove a síntese de NO na medula espinhal (Xu *et al.*, 1996). 2º) A coadministração de ACh e NPS pode aumentar a produção de NO; 3º) NPS e doadores de NO podem facilitar a ligação de substâncias colinérgicas em receptores muscarínicos; 4º) o efeito de NO depende de vários estados redox de NO, portanto ACh pode regular o estado redox de liberação NO e aumentar o efeito supressor de NPS; 5º) NO regula a secreção de alguns outros neurotransmissores além de ACh. Estudos em regiões cerebrais como o hipocampo, estriado, hipotálamo e *locus coeruleus* tem revelado modulação endógena de NO na liberação de neurotransmissores como acetilcolina, catecolaminas, aminoácidos excitatórios e inibitórios, serotonina, histamina e adenosina. Níveis aumentados de NO no tecido favorecem a liberação de neurotransmissores. Como um modulador de função neuronal no cérebro, os efeitos de NO são principalmente mediados por GMPc e glutamato, embora limites de resposta excitatória no mecanismo de NO-GMPc possam acontecer via inibição de receptores NMDA e AMPA; já aumentada liberação de GABA e adenosina podem favorecer a ação de NO (Prast & Philippu, 2001). Portanto NPS teria efeito anticonvulsivante, enquanto ACh teria efeito pró-convulsivo em epilepsia induzida por penicilina. Por sua vez a coadministração de ACh e NPS tem efeito sinérgico e mais efeito anticonvulsivo comparado ao NPS

sozinho (Marangoz *et al.*, 2012). Todavia de acordo com McCarthy e colaboradores (1965) a QUET também poderia ter efeitos anticonvulsivantes em modelos de epilepsia gerados elétrico ou quimicamente. Em pacientes, o uso de QUET como anestésico também foi marcado por ausência de crises que reapareceram após o término do efeito dessa droga (Corssen *et al.*, 1968). No entanto, em gatos a QUET intravenosa induziu descargas epileptiformes no neocórtex, hipocampo e outros núcleos subcortais baseado em registro de EEG. Gatos foram usados em livre movimento e de acordo com o padrão de EEG foi constatado que a QUET afetou o neocórtex e o hipocampo com forte dessincronização. Embora a QUET tenha induzido padrão de crise no EEG, não direciona para convulsão generalizada apesar de interferir na consciência como nas crises de pequeno mal (Kayama & Iwama, 1972). Mas o estudos em voluntários humanos conduzidos por Corssen e colaboradores (1974) revelou que QUET não gera descargas epileptiformes em pacientes com epilepsia e nem em sujeitos normais, sem evidências sobre QUET melhorar ou exacerbar convulsões, em contraste com outros estudos (Kayama & Iwama, 1972; Fang & Wang, 2015). Durante crises prolongadas a atividade e o número de receptores GABA gradualmente diminui e esse evento é considerado como primeira e segunda linha para testar falhas de drogas antiepilépticas. Simultaneamente, a atividade e o número de receptores NMDA aumentam, com ela crises refratárias e o manejo com QUET torna-se favorável (Fang & Wang, 2015). Apesar do seu efeito anticonvulsivante, índices em torno de 5-30% de manifestações psiquiátricas como alucinações, delírios, sensação de flutuação, sonhos e visão borrada devem ser considerados em pacientes com SE refratário tratados com QUET (Fang & Wang, 2015).

6.2 Campo aberto

Um novo paradigma para o tratamento da esquizofrenia tem sido proposto pela modulação do NO (Hallak *et al.*, 2013; Kandratavicius *et al.*, 2014b). Manifestações comportamentais em ratos relacionadas a sintomas e marcadores neurobiológicos na esquizofrenia incluem hiperlocomção, estereotipia, déficit no processamento de informação e função cognitivas (memória de trabalho e atenção) e prejuízo na interação social (Bubenikova-Valesova *et al.*, 2008). Não apenas a hiperlocomção, mas excessiva autolimpeza de animais é um marcador de estereotipia e dependente do sistema dopaminérgico (Dall'Olio *et al.*, 2000). Por sua vez a QUET e outros

antagonistas de NMDA também aumentam a atividade locomotora em roedores (Jentsch & Roth, 1999). Entretanto, por conta da atividade locomotora estar associada com função estriatal límbica, a hiperlocomoção induzida por QUET pode estar diretamente ligada a esquizofrenia. Quanto a exploração do ambiente e comportamento de ansiedade avaliamos três parâmetros de hiperatividade (distância, trajetória no centro e número de vezes em pé). De acordo com as nossas análises no comportamento I após a injeção de pilocarpina ou salina os animais do grupo PILO apresentaram maior taxa de exploração, permaneceram mais tempo no centro da arena e também sobre as patas traseiras do que os animais controle. Esses achados sugerem que o tratamento com PILO tenha aumentado o grau de exploração dos animais, consequentemente o grau de ansiedade e/ou a predisposição a correlatos comportamentais de psicose. No estudo de Wolf e colaboradores (2016) os animais apresentaram aumentada ambulação após a indução de SE por meio de lítio-pilocarpina e moderada elevação sem correlação com o número de crises. Na fase crônica da epilepsia é comum ratos apresentarem hiperatividade (Stewart & Leung, 2003; Dos Santos *et al.*, 2005; Loscher & Brandt, 2010). Também foi relatado no estudo de Stafstrom e colaboradores (1993) hiperatividade em ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzido por ácido caínico 25 dias após o nascimento. O período de avaliação da hiperatividade foi estimado em 6, 13, 43 e 73 dias após o SE sugerindo que alterações comportamentais se iniciam durante a fase silenciosas e se intensificam com o surgimento das crises espontâneas e recorrentes, provável reorganização sináptica. No estudo de camundongos adultos C57BL/6 submetidos ao SE por PILO 25 dias após o nascimento foram observados exploração aumentada no campo aberto, no labirinto em cruz elevado, teste de campo vazado e comportamento similar a ansiedade. Também foi constatado baixo desempenho no labirinto de Morris e baixa aprendizagem, o que sugere que crises epiléticas interferem significativamente no desempenho comportamental desses animais (Muller *et al.*, 2009). Souza e colaboradores (2005) avaliaram o uso de cicloheximida (um bloqueador de fibras musgosas) em ratos induzidos ao SE por PILO e também constataram alta atividade exploratória horizontal, fraco desempenho no labirinto em cruz elevado e de Morris, menor tempo de congelamento e imobilidade dos animais. Portanto, a atividade locomotora e exploração podem ser usadas para avaliar animais epiléticos, e o uso da livre exploração em arena é o teste mais comum para avaliar esses comportamentos (Pitkanen *et al.*, 2006). Normalmente, roedores exploram

ativamente os novos ambientes, mas essa atividade tende a diminuir depois das subsequentes exposições ao mesmo ambiente (habituação) (Pitkanen *et al.*, 2006).

No comportamento II após a administração de QUET com ou sem tratamento de NPS os animais SAL+QUET, PILO+SAL e PILO+QUET ficaram mais tempo no centro da arena, SAL+QUET se manteve mais de pé e em hiperlocomoção, como também PILO+SAL para maior ambulação. Nossos resultados indicam que o modelo de esquizofrenia (SAL+QUET), o modelo de epilepsia (PILO+SAL) e epilepsia com correlato comportamental de psicose (PILO+QUET) foram mais hiperativos que todos os demais grupos. A hiperlocomoção evocada por antagonistas de NMDA tem sido bem caracterizada (Jentsch & Roth, 1999; De Leonibus *et al.*, 2001). A atividade locomotora em roedores pode ser um indicador de propensão para a droga desencadear ou exacerbar psicoses em humanos (Moghaddam *et al.*, 1997). Essa aumentada atividade locomotora em ratos pode ser explicada pelo uso de antagonistas de NMDA que provavelmente facilitam a liberação de dopamina e glutamato (Balla *et al.*, 2001; Chartoff *et al.*, 2005). Em roedores, a aguda administração de QUET, fenilciclidina ou MK-801 produz hiperlocomoção e estereotipia, além de déficit na interação social correlacionados aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (Razoux *et al.*, 2007). A habilidade da QUET para induzir psicose esquizofreniforme implica na disfunção ou desregulação endógena de receptor NMDA que contribui para geração de sintomas, no mínimo em adição a alteração dopaminérgica, glutamatérgica, serotoninérgicas e no ácido gama-aminobutírico, neurotransmissores implicados na patofisiologia da esquizofrenia (Lindfors *et al.*, 1997). Alterações nos neurotransmissores glutamato e dopamina são particularmente envolvidos com sintomas positivos e negativos, e déficits cognitivos observados na esquizofrenia, o que fazem o modelo agudo de QUET ser um modelo útil na explicação da doença (Kandratavicius *et al.*, 2014b; Trevlopoulou *et al.*, 2016). De acordo com o estudo de Razoux e colaboradores (2007) injeção de dose subanestésica aguda (25mg/kg) em ratos produziu hiperlocomoção, estereotipia e ataxia característico de antagonista de NMDA. O máximo score foi observado entre 10 a 15 minutos depois da injeção de QUET e retornou a linha de base depois de 40 minutos o que corroborou com os nossos resultados para os testes realizados no período de 20 minutos. É possível que a dose de QUET que promove efeitos semelhantes aos da esquizofrenia, induza potenciação na transmissão sináptica entre o córtex pré-frontal e o *nucleus accumbens* em ratos em livre movimento. Esse efeito poderia ser mediado pelo aumento dos níveis de glutamato no *nucleus accumbens* e por sua vez ligado a mecanismos de

hiperlocomção e a estereotipia expressos (Razoux *et al.*, 2007). Nossos resultados sugerem que o tratamento por 3 dias com o NPS foi capaz de atenuar a hiperatividade induzida por QUET injetada durante 5 dias e também a PILO previamente injetada há cerca de 30 dias. No comportamento III, última seção comportamental passado o efeito agudo da administração de QUET, NPS ou salina, os animais PILO+SAL, PILO+QUET, PILO+SAL+NPS e PILO+QUET+NPS ficaram mais no centro, enquanto PILO+QUET explorou mais e ficou maior número de vezes em pé. O resultado nos sugere que todos os grupos com epilepsia se mantiveram hiperativos até o final de 71 dias e o tratamento com NPS reverteu o número de elevações no grupo epilepsia+psicose (PILO+QUET) e atividade motora nos animais epiléticos (PILO+SAL).

6.3 PPI

Pacientes esquizofrênicos apresentam déficits no processo de informação que pode ser detectado através da medida de inibição de pré-pulso (PPI) (Geyer *et al.*, 2001; Celikyurt *et al.*, 2012; Issy *et al.*, 2014). Esse mecanismo normalmente inibe a responsividade de 30-500 ms após um estímulo fraco de pré-pulso e reflete uma falha na base protetora do cérebro (Braff *et al.*, 2001a). Em modelo animal o PPI é usado para investigar déficit de processo atencional (Wiley *et al.*, 1997). Bloqueio da inibição pré-pulso significa deficiência do processo de filtragem neuronal, ou seja, transformação de um estímulo externo em resposta (Wiley *et al.*, 1997). Danos na função são reportados em doenças neuropsiquiátricas como esquizofrenia (Takahashi *et al.*; Hallak *et al.*, 2013), doença de Huntington (Swerdlow *et al.*, 1995), síndrome Tourette (Castellanos *et al.*, 1996), desordem compulsiva obsessiva (Hoenig *et al.*, 2005) e epilepsia do lobo temporal com psicose (Celikyurt *et al.*, 2012). Esse fenômeno pode ser medido em humanos e roedores a depender do tipo de estímulo acústico (Hoffman & Ison, 1980; Wiley *et al.*, 1997). A reação muscular é o modo sensível para avaliar o PPI, portanto uma resposta reduzida indica prejuízo de função neuronal. Quando um estímulo de pulso é precedido por um pré-pulso fraco, o reflexo motor pode ser reduzido (Geyer *et al.*, 2001). Para o comportamento I após a injeção de pilocarpina ou salina os animais do grupo PILO apresentaram redução em todas as intensidades de pré-pulso, sem resposta significativa para o sobressalto. Estudos recentes têm mostrado que quanto maior o número de crises maior o déficit no PPI, assim como o dano no filtro sensorio-

motor acompanha os déficits de memória observados na epilepsia crônica (Wolf *et al.*, 2016). É comum pacientes com esquizofrenia apresentarem resposta reduzida de PPI que pode estar correlacionado aos sintomas psicóticos positivos na doença (Braff *et al.*, 2001a; Braff *et al.*, 2001b). O padrão modulatório de PPI parece ser diferente em várias doenças. Na esquizofrenia ou na desordem de personalidade esquizotípica a intensidade de pré-pulso 120 dB suscita em maior inibição pré-pulso do que as intensidade de 30dB ou 60 db (Braff *et al.*, 1978), mas em pacientes com a doença de Huntington o padrão de intensidade de 120dB desencadeia menor inibição que 30-60dB. Déficit no sobressalto são evidentes em pacientes com Huntington que exibem pouco ou nenhuma reposta de PPI. Nesses pacientes a amplitude de sobressalto, latência e habituação são intactos, embora a latência para o sobressalto seja lenta e esteja correlacionado a prejuízo cognitivo medido pela escala de demência (Swerdlow *et al.*, 1995). Pacientes com crises não epiléticas apresentam padrão similar ao de pacientes com esquizofrenia ou personalidade esquizotípica associado a anormalidades dentro do sistema límbico e a circuitaria gânglio basal, portão provável de acesso ao PPI (Pouretmad *et al.*, 1998). Alguns pacientes com epilepsia exibem sintomas psicóticos e déficits de PPI comparáveis a pacientes esquizofrênicos.

Todos os grupos apresentaram redução de PPI comparado ao controle. Para a intensidade de 80db apenas SAL+QUET teve resposta reduzida comparado ao grupo SAL+SAL+NPS. Sugere-se que o NPS possa reverter o prejuízo filtro sensorio motor causado pela injeção de PILO e QUET sendo possível o animal discriminar estímulos externos. Nesse caso NPS poderia funcionar com um filtro para estímulos sensoriais e proteger o sistema nervoso contra excesso de informações. Corroborando com os nossos resultados no estudo de Issy e colaboradores (Issy *et al.*, 2014) o pré-tratamento de ratos naïves com NPS mostrou resposta aumentada para o PPI e bloqueou a interrupção do filtro sensorio motor induzida por anfetamina. Segundo o grupo o NPS aumentou a resposta de PPI de modo dose-dependente e sem relação com a via GMPc e guanilato ciclase solúvel (GCs) já que um inibidor de GCs foi previamente administrado antes do NPS. A sGC é a enzima alvo do NO, responsável por converter o trifosfato de guanosina (GTP) em GMP (Snyder & Brecht, 1991). Esses resultados contrastam com o estudo do mesmo grupo que mostrou que inibidores de NO não modificam a resposta de PPI, mas atenuam a interrupção de PPI induzido por hiperfunção dopaminérgica (Issy *et al.*, 2009). A hiperfunção dopaminérgica é implicada em sintomas positivos de esquizofrenia em modelo animal, incluindo PPI, fortemente regulado pela atividade

dopaminérgica dentro do circuito córtico-límbico-estriado-pálido (Swerdlow *et al.*, 2001). No comportamento III última análise comportamental e após injeções de QUET e NPS o grupo PILO+SAL mostrou redução de resposta para todas as intensidades de PPI comparado ao controle e apenas na intensidade de 72dB em relação ao grupo SAL+QUET. Portanto o prejuízo no filtro sensorio motor de ratos epiléticos se destaca em relação aos animais esquizofrênicos (SAL+QUET) e epilepsia+psicose (PILO+QUET). É provável que crises epileptogênicas ao longo dos 71 dias de protocolo tenha direcionado para déficits maiores no filtro sensorio motor comparado aos demais grupos. Segundo o estudo de Labbate e colaboradores (Labbate *et al.*, 2014) crises epiléticas prolongadas ao longo do desenvolvimento de filhotes promoveram déficits de inibição pré-pulso quando os ratos foram testados na fase adulta. Portanto crises epileptogênicas seriam as responsáveis por interromper o PPI e reduzir o volume bilateral do hipocampo dorsal dos roedores na fase adulta, sugerindo que crises recentes aumentam o risco para fenótipos esquizofrênicos tardios (Labbate *et al.*, 2014). Corroborando em partes com os nossos resultados, sugere-se que persistentes crises epileptogênicas seriam responsáveis pelo prejuízo no filtro sensorio motor dos animais PILO+SAL, assim como mostrado em modelo animal de epilepsia (Wolf *et al.*, 2016).

6.4 Testes de memória

6.4.1 Reconhecimento de objeto

Para avaliar a memória episódica de ratos, a tarefa de reconhecimento de objeto tem se tornado um modelo investigativo no estudo de alterações de memória (Goulart *et al.*, 2010). Prejuízo no reconhecimento de objeto é uma característica comum na esquizofrenia e pode estar associada com hipofunção de receptores NMDA em pacientes esquizofrênicos (Javitt, 2009). A habilidade de antagonistas de NMDA induzir sintomas parecidos com esquizofrenia em distúrbios cognitivos sugere uma disfunção endógena desse receptor crítica para o entendimento de mecanismos patogênicos básicos. Receptores NMDA permitem um influxo de íons cálcio e sódio, em que o primeiro ativa uma cascata de segundo mensageiro que altera conexões pré e pós-sinápticas em neurônios via potenciação de longo prazo (LTP) e depressão a longo prazo em neurônios. Portanto déficits na função NMDA direciona para déficits na aquisição de novas informações que tem sido descritas na esquizofrenia (Javitt, 2009). Tem sido reportado que receptores NMDA são requeridos para formação de memória na

tarefa de reconhecimento de objeto (Baker & Kim, 2002; Winters & Bussey, 2005). Essa atividade é baseada na habilidade exploratória natural de roedores expostos a um novo ambiente (Ennaceur & Delacour, 1988). O reconhecimento de objeto permite obter informação rápida, sem a presença de estímulo aversivo ou restrição alimentar e hídrica. Sabe-se que um ambiente novo pode desencadear estresse no animal e este é um fator precipitante de crises em pacientes com epilepsia (Nakken *et al.*, 2005). O teste de reconhecimento de objeto não é processo isolado, inclui familiaridade de exposição ao objeto ou quando/e onde foi previamente encontrado (Barker & Warburton, 2011). De acordo com os nossos resultados os animais PILO+SAL e PILO+QUET exploraram o objeto novo por um tempo menor do que os animais controles, segundo a percentagem do tempo gasto de exploração no novo em detrimento ao familiar. Ratos exibem uma tendência natural em gastar mais tempo explorando objeto novo do que objeto familiar, e essa preferência pode ser usado como índice para reconhecimento de objeto (Mumby *et al.*, 2005). De acordo com os nossos resultados, o estudo sobre epilepsia associada a malformações do desenvolvimento cortical em ratos de Zhou e colaboradores (Zhou *et al.*, 2011), revelou prejuízo na execução da tarefa de reconhecimento de objeto. Modelos animais de epilepsia induzidos por PILO e ácido cáínico revelaram déficits no reconhecimento de objeto novo a longo prazo. Porém, um retardo de 5 minutos poupou os modelos no erro de reconhecimento do objeto. Nesse caso é sugerido aos quimioconvulsivantes prejuízo para execução de memória a longa prazo. Detour e colaboradores (2005) também encontraram significativo déficit na tarefa de reconhecimento de objeto novo, após 24 horas de atraso no modelo de epilepsia induzido por lítio-pilocarpina. Também Patel e colaboradores (Pearson *et al.*, 2014) avaliaram o efeito de indução de SE induzido por ácido cáínico e PILO e a resposta dos animais com relação ao aprendizado e memória no teste de reconhecimento de objeto novo. De acordo com o estudo, déficits para a tarefa foram encontrados em ambos os modelos de epilepsia para o reconhecimento de objeto novo. Nesse caso o reconhecimento de memória é afetado de acordo com o quimioconvulsivante para a indução do SE e resulta em padrões diferentes de neurodegeneração. É provável que o córtex perirrinal seja menos afetado pelo modelo lítio-pilocarpina e pode explicar a discrepância observada em outros modelos onde o hipocampo é área mais prejudicada (Mumby *et al.*, 2005). Os prejuízos cognitivos na esquizofrenia afetam funções como a atenção, memória e desempenho intelectual (Kandratavicius *et al.*, 2014b; Trevlopoulou *et al.*, 2016). Déficits cognitivos são alvos na intervenção terapêutica já que a eficácia

de antipsicóticos é incerta para a condição (Nikiforuk *et al.*, 2016). Alternativas como o bloqueio de receptores de serotonina (5-HT_{5A}) no modelo animal de esquizofrenia também pode fornecer pistas nos déficits cognitivos através do uso de tarefa de reconhecimento de objeto. No estudo de Nikiforuk e colaboradores (2016) o antagonista SB-699551 de 5-HT_{5A} reverteu o prejuízo cognitivo causado pela QUET e o isolamento social em ratos, o que demonstra que alternativas terapêuticas podem ser mais um tratamento para déficits cognitivos e sintomas negativos na esquizofrenia. Corroborando com os nossos resultados Antonio e colaboradores (2015) avaliaram as alterações de memória em camundongos e o efeito de LASSBio-579, haloperidol e clozapina no desempenho da tarefa de reconhecimento de objeto. De acordo com o grupo os animais que receberam QUET exploram os objetos novo e familiar sem diferença significativa, diferente do grupo controle que ficou mais tempo explorando o “novo” durante a sessão do teste. Isso comprova que tratamento com QUET resultou em déficit visual de aprendizado e memória na codificação/consolidação e fase de recuperação da memória. Esses resultados também corroboram com os resultados de Goulart e colaboradores (2010) e Bouladakis e Pitsikas (2011) que mostraram o prejuízo da QUET nos diferentes estágios do reconhecimento de memória. Melhora na aquisição de memória é comprovada em camundongos quando a produção de NO e expressão de NOS neuronal foram induzidas, e o efeito abolido pelo inibidor de NO (Weitzdoerfer *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2013a; Yu *et al.*, 2013b). Porém, em nossa casuística o tratamento com NPS não foi capaz de reverter os déficits cognitivos de memória declarativa avaliada no teste de reconhecimento de objeto. Diferente dos nossos resultados, outros estudos com doadores de óxido nítrico (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) apresentaram efeito na memória espacial de trabalho em animais controle (Yamada *et al.*, 1996), e também o uso de molsidomina (2 a 4 mg/kg) ou NPS (0,3 a 1 mg/kg) reverteram prejuízos da apomorfina (1mg/Kg) na tarefa de reconhecimento de objeto (Gourgiotis *et al.*, 2012). Segundo resultados prévios do nosso grupo, o uso de NPS atenuou os efeitos da QUET (30mg/kg), mas sem interferência na memória de curto prazo (Kandratavicius *et al.*, 2014b). Tratamento terapêutico com NPS foi capaz de resgatar memória de longo prazo em animais injetados com QUET (30 mg/kg). Também de acordo com os resultados de Pitsikas e colaboradores (2015) o NPS (0,3 e 1 mg/kg) reverteu déficit de memória a curto prazo, compensou o prejuízo de isolamento social induzido por QUET (8mg/kg) na concentração de 1mg/kg de NPS. Todavia o efeito ansiolítico de NPS (1mg/kg) não interferiu na atividade locomotora.

6.4.2 Labirinto

Prejuízo cognitivo é uma comorbidade comum em epilepsia, especialmente pronunciado em pacientes refratários a crises epiléticas (Pearson *et al.*, 2014). Esses prejuízos incluem déficits na memória espacial e memória declarativa (Abrahams *et al.*, 1999; Viskontas *et al.*, 2000; Guerreiro *et al.*, 2001) que contribuem significativamente para a déficits de memória em pessoas com epilepsia (Pearson *et al.*, 2014). A multiplicidade de fatores como antecedentes genéticos, estado e história da medicação, e outras comorbidades como ansiedade e depressão podem impactar negativamente a função cognitiva (Pearson *et al.*, 2014). Modelos quimioconvulsivantes de ELT oferecem vantagem para estudos cognitivos associados a epilepsia. O uso de roedores permite identificar potenciais mecanismos envolvidos com a crise e com danos cognitivos, além de testes pré-clínicos com candidatos terapêuticos para o tratamento de disfunções cognitivas adquiridas na epilepsia (Brooks-Kayal *et al.*, 2013). Processos de memória também estão envolvidos com a formação hipocampal. Ratos com lesões nesta área apresentam baixo desempenho de tarefa de memória espacial quando comparado aos animais controle (Keefe & Nadel, 1978; Campbell & Bedi, 1989). Estudos experimentais em roedores tem direcionado o hipocampo como responsável por tarefas relacionadas a memória e aprendizado (Jarrard, 1993). Nos ratos células piramidais hipocampais executam funções de localização no ambiente (Muller *et al.*, 1987) e mantém o campo receptivo onde não existe pistas visuais e espacial (Quirk *et al.*, 1990). Portanto lesões hipocampais danificam a habilidade de execução de tarefa espacial e aprendizado no labirinto radial e o labirinto de Morris (Morris *et al.*, 1982; Feasey-Truger *et al.*, 1993). De acordo com os nossos resultados o grupo com epilepsia (PILO+SAL) e o tratado com NPS (PILO+SAL+NPS) gastaram mais tempo para pegar o primeiro pellet, e foi revelada uma tendência de PILO+QUET+NPS em relação ao controle. Nossos resultados corroboram com o estudo de Wolf e colaboradores (2016) que usaram modelo de crises espontâneas crônicas induzidas por Li-PILO sistêmica e SE de 2 horas para avaliar memória de trabalho. Os animais epiléticos claramente apresentaram baixa performance na tarefa de labirinto comparado ao grupo remanescente e àqueles que não desenvolveram SE após indução com Li-PILO. Também pobre desempenho como reentrância a braços já visitados foi correlacionado ao número de crises espontâneas. De fato, o alto número de revisitas do grupo epilético pode ser atribuído a hiperlocomção ao invés de prejuízo na memória de trabalho. Portanto sugere-se que a hiperatividade dos animais tenha retardado o tempo para

alcançar o primeiro pellet, assim como tratamento com NPS não reverteu a hiperlocomção ou o dano cognitivo induzido pela PILO. Também no estudo de Leite e colaboradores (1990b) os ratos induzidos ao SE por PILO e apresentando CREs apresentaram maior número de erros no labirinto radial de 8 braços e baixa performance de desempenho até o final do teste. Portanto a baixa performance de aprendizagem, sugere que CREs induzidas por PILO são um modelo útil para avaliar prejuízo de memória e aprendizado na epilepsia. Também segundo os nossos resultados o modelo animal de esquizofrenia (SAL+QUET) teve baixa performance no treino comparado ao grupo epiléptico (SAL+PILO). A memória de trabalho é o centro do prejuízo cognitivo em pacientes esquizofrênicos (Enomoto & Floresco, 2009). Sua disfunção está associada ao córtex pré-frontal e desregulação de dopamina (Goldman-Rakic *et al.*, 2004). O uso de antagonistas como QUET e fenilciclidina são indutores persistentes de déficits na memória trabalho (Enomoto & Floresco, 2009). Segundo os nossos resultados no treino o grupo SAL+QUET teve maior prejuízo no tempo de execução da tarefa do que o grupo epiléptico (PILO+SAL). De acordo com Floresco e colaboradores (Enomoto & Floresco, 2009) os efeitos subcrônicos de QUET na memória de trabalho seriam dose-dependente, no qual 10 dias (20 injeções), mas não 5 dias (10 injeções) seria insuficiente para prejudicar o desempenho da tarefa. Nesse caso 5 dias de tratamento com a QUET seria insuficiente para causar alterações neuronais persistentes e interromper a performance de memória de trabalho. Contrapondo nossos resultados os animais SAL+QUET que receberam QUET por 5 dias apresentou baixa performance de desempenho e atraso na tarefa comparado ao grupo epiléptico (PILO+SAL). Os nossos resultados também corroboram com a avaliação comportamental em ratos submetidos ao estresse crônico (estresse de nado, plataforma elevada e contenção) e injetados com QUET (41-45 dias pós-natal). Segundo o teste de memória os animais estresse+QUET mostrou baixa performance de desempenho comparado ao controle, além de anedonia (falta de motivação para a comida) de acordo com Ram e colaboradores (2013). Também o nosso grupo PILO+SAL gastou menos tempo para concluir a tarefa comparado ao grupo controle, provavelmente devido a hiperatividade dos animais comparado àqueles que receberam QUET. Apesar da relação entre o uso de quimiconvulsivantes e déficits de memória (Brooks-Kayal *et al.*, 2013; Pearson *et al.*, 2014), em modelo animal de epilepsia por abrasamento elétrico também há déficits na performance de labirinto radial, além de perda neuronal hipocampal e límbica (Leite *et al.*, 1990b). No teste o grupo SAL+QUET demorou mais tempo para recolher os 4

pellets que o PILO+SAL, grupo controle e àqueles tratados com NPS (SAL+SAL+NPS) e (SAL+QUET+NPS) o que sugere que o doador de óxido nítrico não interferiu no tempo de execução da tarefa. A memória espacial de trabalho mostrou-se comprometida nos animais que receberam SAL+PILO e PILO+QUET uma vez que cometeram maior número de erros durante o treino e o teste. Em contrapartida o tratamento com NPS melhorou o desempenho dos animais SAL+QUET e não interferiu no prejuízo de memória nos animais SAL+PILO. Corroborando com os nossos resultados para o modelo de esquizofrenia, o estudo de Zou e colaboradores (Zou *et al.*, 1998) mostrou que o uso de inibidores de NOS como L-NAME e 7-NI prejudicou a tarefa de aquisição de memória no labirinto radial, enquanto o uso de L-Arginina (doador de NO) aumentou a acurácia dos ratos para decisão do braço, assim como reduziu o número de erros de memória durante os últimos 10 dias de teste, sem repercussão para os 20 dias de treinamento. Nesse caso torna-se concebível que o comprometimento no desempenho no labirinto radial de oito braços é devido a inibição da produção de NO no cérebro. Porém a uso de precursor de NO como a L-Arginina, aumentou a acurácia de escolha dos ratos, pela redução de erros de memória no 21º ao 30º dia de treino, embora inibidores de NOS não apresentaram efeito, exceto no aumento de tempo para completar a tarefa induzido pelo 7-NI. É provável que a produção de NO esteja em alta em fases recentes de treino, mas reduza com a repetição de treinos. Em suma, os inibidores de NOS interromperam a performance em fases recentes de treino cuja produção de NO está alta no cérebro, mas seus efeitos desapareceram na fase tardia de testes, uma vez que a produção de NO é reduzida (Zou *et al.*, 1998).

6.5 Neuropatologia

Observamos perda neuronal significativa em CA3, CA2, CA1, *nucleus reuniens*, e nos córtices entorrinal, pré-límbico e infralímbico dos animais do grupo epilepsia pura (PILO+SAL). A perda neuronal direcionada à subcampos hipocâmpais específicos é bem descrita em modelos animais de epilepsia, assim como pacientes com epilepsia do lobo temporal farmacorresistente (Persinger *et al.*, 1988; Leite *et al.*, 1990a; Kandratavicius *et al.*, 2014c). Além do hipocampo, perda neuronal é observada em outras regiões cerebrais em modelos experimentais. Por exemplo, perda neuronal também é frequente no tubérculo olfatório, amígdala, córtex piriforme, neocórtex e núcleo talâmico do modelo de pilocarpina (Persinger *et al.*, 1988; Leite *et al.*, 1990a;

Cavalheiro, 1995). É provável que a morte celular esteja ligada ao efeito citotóxico da PILO no hipocampo ou mesmo à intensidade ou severidade das crises epiléticas. De acordo com Gomes (2011) ocorre aumento do estresse oxidativo durante o SE e CREs induzida por PILO e ácido caínico. A superprodução de espécies reativas de oxigênio pode promover a liberação excessiva de glutamato, aumentando a concentração de cálcio intracelular, modificando a homeostase de Ca^{2+} e matando neurônios (Gomes *et al.*, 2011). Além da perda neuronal, estudos demonstram progressão na frequência de crises com o decorrer do tempo (Mathern *et al.*, 1996) e prejuízos cognitivos (Coras *et al.*, 2014).

No grupo SAL+QUET, apenas na região CA3 observamos redução significativa na densidade neuronal, se comparado ao grupo controle. Perda neuronal no hipocampo foi relatada na esquizofrenia (Jeste & Lohr, 1989; Bogerts *et al.*, 1993; Jonsson *et al.*, 1997). Lesões alvo em modelo animal de esquizofrenia tem demonstrado o envolvimento de agentes tóxicos que destrói o tecido neuronal através de estimulação excitatória de glutamato envolvido com receptores agonistas (Marcotte *et al.*, 2001). Outras observações demonstraram tendência à menor densidade neuronal no grupo com psicose, especialmente em CA3 e CA4 (Kandratavicius, 2007). Sabe-se que a administração aguda de altas doses de fenilciclidina (80mg/kg, peso do rato) causa efeito tóxico, degeneração de neurônios no córtex retrosplenial e morte da subpopulação de neurônios estriatais. Do mesmo modo, sugere-se que a QUET também possa promover perda celular em diferentes regiões do cérebro (Keilhoff *et al.*, 2004b). Nossos dados, entretanto, não evidenciaram perda significativa na população neuronal relacionada à administração de quetamina sozinha (SAL+QUET). Ainda segundo Keilhof e colaboradores (2004b), doses subanestésicas de QUET pode promover neurogênese no hipocampo e zona subgranular de roedores, porém esta não seria grande o suficiente para ocultar a perda neuronal observada neste modelo. Deste modo, não podemos descartar a colaboração da neurogênese induzida por quetamina sobre a manutenção da densidade neuronal observada em nosso grupo SAL+QUET.

Comorbidades psiquiátricas são frequentemente observadas em indivíduos com ELT (Kandratavicius *et al.*, 2012b; Castro *et al.*, 2015; Mula, 2016). Disfunções neuroquímicas e estruturais envolvendo o sistema límbico podem estar ligadas às comorbidades psiquiátricas nos pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) (Swerdlow, 2010). Evidências neuropatológicas sugerem que a esclerose hipocampal em pacientes com ELT é a estrutura básica para sintomas psiquiátricos, associada a

perda neuronal no hipocampo e também perda neuronal e gliose na amígdala e córtex entorrinal (Suckling *et al.*, 2000; Kandravicius *et al.*, 2012a). Também anormalidade na circuitaria córtico-frontal-mesolímbica vista em modelo animal estaria relacionada a disfunções dopaminérgica e altas taxas de psicoses em pacientes com ELT (Kandravicius *et al.*, 2012b; Wolf *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstram perda neuronal no grupo PILO+QUET na maior parte das regiões avaliadas, inclusive quando comparados aos animais submetidos à pilocarpina apenas (PILO+SAL). Todavia, PILO+QUET não apresentou diferença significativas na região do córtex cingulado e no *reuniens* em relação ao controle. Sintomas psiquiátricos associados com ELT podem envolver disfunções que envolvem o hipocampo, amígdala, córtex piriforme e entorrinal, em adição ao núcleo talâmico medial. Com relação ao correlato comportamental de psicose (PILO+QUET) é provável perda acentuada pelo antagonista de NMDA. O estudo de Bujas-Bobanovic e colaboradores (2000) mostra que a fenilciclidina em ratos induz ativação neuronal dispersa, marcada via expressão de c-fos, o que sugere que os animais estão sujeitos a perda neuronal em diferentes regiões do cérebro. A maior perda neuronal observada nos animais do grupo PILO+QUET pode estar relacionada à pior performance deste grupo no labirinto radial. Foi observado aumento da densidade neuronal no grupo SAL+SAL+NPS em relação aos grupos controle (córtex cingulado, *nucleus accumbens*, entorrinal e *subiculum*), SAL+QUET (*nucleus accumbens*, córtex entorrinal, córtex cingulado, amígdala e *subiculum*) e SAL+QUET+NPS (*nucleus accumbens*, amígdala e *subiculum*). Também não observamos efeitos protetores do tratamento com NPS sobre a perda neuronal observada nos grupos tratados por PILO (PILO+SAL+NPS e PILO+QUET+NPS), a exceção de proteção no córtex entorrinal e *subiculum*. Ao contrário, observamos aumento significativo da perda neuronal após tratamento com NPS no córtex cingulado, córtex perirrinal, amígdala e *nucleus accumbens*. Estudos tem relatado resultados contraditórios sobre o papel de NO na neurogênese e morte neuronal. Enquanto alguns documentaram neurodegeneração (Loiacono & Beart, 1992), evidências recentes apontam que o NO tem efeito protetor nos estágios iniciais da neurogênese (em especial pós-cries epilépticas), mas pode afetar a sobrevivência de neurônios jovens (Carreira *et al.*, 2015).

A avaliação imunohistoquímica da expressão da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) evidenciou maior marcação para todos os grupos nas regiões da camada granular, *nucleus accumbens*, amígdala, núcleo talâmico médio dorsal em

relação ao grupo controle. O grupo PILO+SAL também apresentou maior marcação em CA1, CA2 e entorrinal, enquanto o grupo PILO+QUET também apresentou marcação na região de CA3. O grupo SAL+QUET+NPS apresentou maior marcação que os grupos controles e SAL+QUET na região do hilo, núcleo talâmico médio dorsal, córtex cingulado, *nucleus accumbens* e ectorrinal, enquanto o grupo SAL+SAL+NPS marcou positivamente no córtex perirrinal. PILO+SAL+NPS e PILO+QUET+NPS apresentaram maior marcação do que os controles na região do hilo, entorrinal e córtex perirrinal. Finalmente, os grupos PILO+SAL e PILO+QUET apresentaram maior marcação no entorrinal e córtex perirrinal. Embora a isoforma de nNOS seja considerada constitutiva, sua expressão pode ser induzida em algumas condições, como em processos neurodegenerativos como esquizofrenia e epilepsia, sendo frequentemente associados a circuitaria excitatória (Kandratavicius, 2007).

O NO atua em vários processos como migração celular, sinaptogênese, neurotransmissão e habilidades cognitivas (Bernstein *et al.*, 2005). Alterações patológicas como a baixa densidade de neurônios NADPH-d positivos nos córtices frontal e temporal e alta densidade de neurônios NADPH-d na substância branca das regiões frontais e temporais pode ser responsável pela alteração no sistema nitrérgico desses pacientes (Akbarian *et al.*, 1993). Em cérebros normais esses neurônios são encontrados no mais alto número na camada branca imediatamente profundos a camada VI do córtex, remanescentes da placa neural embrionária. A área pré-frontal dorsolateral em pacientes com esquizofrenia mostrou um declínio em NADPH-d na camada branca superficial, sobrejacente ao córtex, mas um significativo aumento desses neurônios na camada branca mais profunda a 3 mm do córtex. Esses achados são consistentes com os distúrbios de subcamada durante o desenvolvimento em que o padrão normal de célula programada para a morte está comprometido e vem acompanhado por um defeito na migração de neurônios antigos em direção a camada cortical (Akbarian *et al.*, 1993). Por sua vez o NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina através da NOS. Essa enzima é dependente de NADPH e Ca^{2+} /calmodulina que produz quantidades iguais de NO e L-citrulina em que NO altamente permeável se difunde para fora da célula rapidamente (Zhang & Snyder, 1995). Por sua vez NADPH-d que é co-expressa com, e pode ser idêntica a NOS pode alterar a distribuição dessa enzima no cérebro de pacientes com esquizofrenia (Akbarian *et al.*, 1993; Ramirez *et al.*, 2004). Também essa distribuição alterada de neurônios NADPH-d também estaria relacionada à redução dos níveis de metabólitos de NO, nitrito e nitrato, nos fluídos cérebro-espinhais de pacientes

esquizofrênicos (Ramirez *et al.*, 2004). Também especula-se que a ação inibitória do NO sobre transportadores monoaminérgicos, (i.e., impede a captação de dopamina, noradrenalina e serotonina) reforça a importância do NO nos distúrbios psiquiátricos (Kiss & Vizi, 2001). Estudos com inibidores específicos e inespecíficos da nNOS, enzima responsável pela produção de NO em neurônios, indicam atuação dual do óxido nítrico, tanto inibindo como promovendo sintomas psicóticos. Por exemplo, o bloqueio da nNOS reverte a hiperlocomoção e a interrupção da inibição pré-pulso induzida pela fenilciclidina em camundongos (Klamer *et al.*, 2004). Por outro lado, outros estudos indicam que o tratamento com doador de óxido nítrico reverte os efeitos comportamentais de modelos de psicose dependentes de receptores NMDA. Por exemplo, o NPS reverte os efeitos comportamentais da fenilciclidina (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000).

Estudos de nosso grupo também demonstraram efeito antipsicótico do tratamento com NPS tanto em pacientes com esquizofrenia como em modelos animais de psicose aguda (Hallak *et al.*, 2013; Kandratavicius *et al.*, 2014b). No presente estudo, não observamos alteração significativa na expressão de nNOS no grupo de psicose pura (SAL+QUET), porém o tratamento com o doador de óxido nítrico NPS em animais submetidos à quetamina (SAL+QUET+NPS) induziu aumento significativo na expressão da enzima neuronal no hilo, núcleo médio-dorsal do tálamo, *nucleus accumbens*, córtex cingulado e córtex ectorrinal comparado aos grupos controle e SAL+QUET. Nossos resultados também demonstraram aumento significativo da área imunorreativa para nNOS nos grupos tratados com NPS (SAL+QUET+NPS e SAL+SAL+NPS) em relação aos controles no hilo, no córtex cingulado, nos núcleos talâmicos médio dorsal e ventromedial, no *nucleus accumbens* e no córtex perirrinal. No córtex cingulado o grupo SAL+QUET+NPS também apresentou maior área imunomarcada quando comparado ao grupo SAL+SAL+NPS. No ectorrinal, os grupos SAL+QUET e SAL+QUET+NPS apresentaram maior área imunomarcada que o grupo controle. Observamos ainda que o nível de expressão de nNOS foi maior em algumas regiões em relação às outras. Estudos prévios demonstraram que a expressão de nNOS varia de uma região cerebral para outra: enquanto nNOS está presente em torno de 2% dos neurônios no córtex cerebral (Snyder & Bredt, 1991), mais de 20% dos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico expressam a enzima (Bernstein *et al.*, 1998). Níveis mais altos de nNOS foram observados na área septal, córtex cerebelar, *nucleus accumbens*, hipotálamo e subtálamo, enquanto o mais baixo nível foi encontrado no

corpo caloso, talâmo, córtex occipital e núcleo dentado cerebelar do cérebro humano (Blum-Degen *et al.*, 1999). É interessante notar que células gliais e endoteliais também podem expressar esta enzima (Kawakami *et al.*, 1998; Stanarius *et al.*, 1998). Em suma, observamos que o tratamento com doador de óxido nítrico promoveu aumento da expressão da enzima nNOS em nosso modelo de esquizofrenia.

Na epilepsia, estudos indicam efeitos tanto pró como anticonvulsivantes para o óxido nítrico (Arzimanoglou *et al.*, 2002). Observamos aumento da área imunorreativa para nNOS nos grupos PILO+SAL em relação aos controles, ratos do grupo SAL+QUET e ratos do grupo epilepsia com psicose interictal (PILO+QUET) na (camada granular, em CA2, CA3, no córtex entorrinal e no núcleo talâmico mediodorsal). Em pacientes com ELT, estudos indicaram aumento na expressão de nNOS tanto no hipocampo (Leite *et al.*, 2002a) como no neocórtex (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2000). Aumento da produção de NO foi descrita em modelos de crises induzidas por ácido caínico (Mulsch *et al.*, 1994; Gabriel *et al.*, 2000) e pilocarpina (Van Leeuwen *et al.*, 1995). Ainda em modelos experimentais, a combinação de substrato de NO com um inibidor da NOS indicou redução dos efeitos neurotóxicos do ácido caínico no hipocampo de ratos (Gabriel *et al.*, 2000). Os grupos controles e PILO+SAL apresentaram maior área imunomarcada para nNOS que PILO+SAL+NPS nas regiões de CA1 e CA2, enquanto o grupo PILO+SAL+NPS apresentou maior área imunopositiva, comparado com controle e PILO+SAL, no córtex pré-límbico, no núcleo talâmico médio dorsal, *nucleus accumbens*, amígdala, ectorrinal e *reuniens*. Novamente, um aumento de expressão de nNOS nos animais tratados com NPS.

A avaliação dos animais com epilepsia e psicose comórbida (grupo PILO+QUET) evidenciou variação na expressão de nNOS. Uma vez que na epilepsia há aumento de nNOS hipocampal, enquanto na esquizofrenia há redução (Kandratavicius, 2007), era esperado um padrão intermediário para os casos de epilepsia com psicose comórbida. Em pacientes com epilepsia e psicose interictal, observa-se menor imunorreatividade para nNOS para algumas regiões, como CA1, CA2 e parasubículo (Kandratavicius, 2007). De fato, enquanto em CA2 os níveis de nNOS do grupo PILO+QUET segue o padrão de redução observado no grupo SAL+QUET, no *nucleus accumbens* houve aumento da área imunopositiva para nNOS. Em relação ao tratamento com NPS nos animais com psicose e epilepsia (PILO+QUET+NPS), foi observado maior área imunopositiva em CA2 e no córtex entorrinal, em comparação ao grupo PILO+QUET. Ou seja, o tratamento com NPS em animais com epilepsia e

psicose comórbida reverteu a queda de expressão de nNOS em CA2, importante região hipocampal recentemente envolvida na formação de memória social (Piskorowski *et al.*, 2016). Segundo o estudo de Hitti e colaboradores (2014) a inativação genética de neurônios piramidais em CA2 causou pronunciada perda social de memória, habilidade do animal se recordar de indivíduos da mesma espécie, sem alteração na sociabilidade ou comportamentos dependentes do hipocampo como memória espacial e contextual. Também a inativação de neurônios piramidais em CA2 não alterou a locomoção ou comportamento de ansiedade em camundongos. Assim como não alterou a memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris, embora os animais tenham aprendido a tarefa de modo lento. Resultados anatômicos e comportamentais mostram que CA2 é o centro do processamento de memória sócio-cognitiva e disfunções no subcampo contribuem para desordens psiquiátricas e uma redução de neurônios inibitórios na esquizofrenia (Hitti & Siegelbaum, 2014). Uma menor densidade de interneurônios parvalbumina-positivos também foi encontrada em CA2 nos cérebros *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos e modelos farmacológicos animais (Berretta *et al.*, 2009). A importância de parvalbumina ainda não é clara, mas prejuízos na sua função podem estar relacionados a interrupção da sincronia da rede hipocampal e profunda mudança em memória espacial e de trabalho, tais consistentes mudanças são observadas no hipocampo de pacientes com esquizofrenia (Korotkova *et al.*, 2010). De acordo com Rich e colaboradores (2016) também o hipocampo, amígdala e *nucleus accumbens* são regiões envolvidas com o processamento sensorial e emocional. Anormalidade como redução de volume no hipocampo (Herold *et al.*, 2013), amígdala (Watson *et al.*, 2012) e *nucleus accumbens* (Lauer *et al.*, 2001) tem sido reportada na esquizofrenia. O *nucleus accumbens*, parte integrante e importante da circuitaria límbica e pré-frontal talâmico-córtico-estriado-pálido está envolvido em várias funções cognitivas, emocional e psicomotora alterada na esquizofrenia. Em modelo animal, distúrbios de desenvolvimento dentro do córtex entorrinal e hipocampo induz uma desregulação de entrada para o *nucleus accumbens* resultando em anormalidade comportamental para a psicopatologia psicótica (Lauer *et al.*, 2001). O *nucleus accumbens* também está envolvido em comportamento de antecipação, respostas de recompensa e eventos aversivos comportamentais que são anormais na esquizofrenia (Greer *et al.*, 2014; Womer *et al.*, 2014). Já o córtex entorrinal, porção anterior do lobo temporal medial, representa uma porta de entrada para a integração de informações multissensoriais entre as áreas corticais e do hipocampo com papel importante na patofisiologia da

esquizofrenia (Schultz *et al.*, 2010). Estudos *post-mortem* têm revelado anormalidades no tamanho de neurônios e interrupção da camada cortical. Além de redução no volume do entorrinal de acordo com estudos de ressonância magnética em pacientes esquizofrênicos, o córtex entorrinal é conhecido por enviar a maior projeção neuronal para o *nucleus accumbens* que modula a liberação de dopamina em áreas mesolímbicas. Experimentos em animais revelaram que lesões recentes no córtex entorrinal de neonatos, aumentaram a liberação de dopamina mesolímbica e uma excessiva atividade locomotora em ratos foi identificada após prolongado intervalo de desenvolvimento (Sumiyoshi *et al.*, 2004).

7. CONCLUSÃO

Animais com epilepsia e psicose tratados com NPS tiveram menor frequência de crises que os não tratados. Além disso, o tratamento com NPS teve efeito ansiolítico no modelo animal de epilepsia com e sem psicose, e diminuiu os correlatos comportamentais de sintomas positivos dos animais no modelo de psicose e no de epilepsia+psicose. O efeito do tratamento com NPS quanto aos sintomas positivos perdurou por cerca de 4 semanas nos animais com epilepsia e psicose. A memória de curto prazo para reconhecimento de objetos foi semelhante aos controles nos animais do modelo de epilepsia com e sem psicose que receberam tratamento com NPS. Já na memória de trabalho, o NPS melhorou o desempenho de animais do modelo de psicose, mas não os de epilepsia com ou sem psicose. O tratamento com NPS reverteu a perda neuronal em regiões como o córtex entorrinal e *subiculum* de animais com epilepsia, mas causou perda neuronal em animais controle na camada granular e córtex pré-límbico. Um aumento crônico na expressão de nNOS foi visto em diversas regiões cerebrais nos animais com epilepsia e nos tratados com NPS, podendo ser responsável pelos efeitos comportamentais observados no tratamento com NPS. Em resumo, o tratamento com NPS foi efetivo na amenização de sintomas correlatos comportamentais de psicose no modelo puro e no comórbido com epilepsia. Além disso, não exacerbou crises e contribuiu para diminuição delas nos animais do modelo de epilepsia e psicose, que apresentou grandes similaridades com o que é encontrado em casos clínicos. Nossos

resultados sugerem que o uso do NPS pode ter resultados na melhoria dos sintomas da psicose interictal humana, assim como já observado para a esquizofrenia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Dargham A & Laruelle M. (2005). Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry* **20**, 15-27.
- Abrahams S, Morris RG, Polkey CE, Jarosz JM, Cox TC, Graves M & Pickering A. (1999). Hippocampal involvement in spatial and working memory: a structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis. *Brain and cognition* **41**, 39-65.
- Akbarian S, Bunney WE, Jr., Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA & Jones EG. (1993). Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry* **50**, 169-177.
- Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H & Savas HA. (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**, 995-1005.
- Al-Nuaimi S, Chaves C & Hallak JEC. (2010). New perspectives and directions in schizophrenia therapeutics: advances related to non-dopaminergic systems. *RevBra de Psiq* **32**, 336-338.
- Antonio CB, Betti AH, Herzfeldt V, Barreiro EJ, Fraga CA & Rates SM. (2015). LASSBio-579, a prototype antipsychotic drug, and clozapine are effective in novel object recognition task, a recognition memory model. *Behavioural pharmacology*.
- Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P & Pereira de Vasconcelos A. (2002). Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. *Epileptic Disord* **4**, 173-182.
- Baker KB & Kim JJ. (2002). Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learning & memory* **9**, 58-65.
- Balla A, Koneru R, Smiley J, Sershen H & Javitt DC. (2001). Continuous phencyclidine treatment induces schizophrenia-like hyperreactivity of striatal dopamine release. *Neuropsychopharmacology* **25**, 157-164.
- Barker GR & Warburton EC. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 10721-10731.
- Bates JN, Baker MT, Guerra R, Jr. & Harrison DG. (1991). Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol* **42 Suppl**, S157-165.

- Bergman SA. (1999). Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesth Prog* **46**, 10-20.
- Bernstein HG, Bogerts B & Keilhoff G. (2005). The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophrenia research* **78**, 69-86.
- Bernstein HG, Keilhoff G, Seidel B, Stanarius A, Huang PL, Fishman MC, Reiser M, Bogerts B & Wolf G. (1998). Expression of hypothalamic peptides in mice lacking neuronal nitric oxide synthase: reduced beta-END immunoreactivity in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* **68**, 403-411.
- Berretta S, Gisabella B & Benes FM. (2009). A rodent model of schizophrenia derived from postmortem studies. *Behav Brain Res* **204**, 363-368.
- Bertram E. (2007). The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* **48 Suppl 2**, 65-74.
- Blum-Degen D, Heinemann T, Lan J, Pedersen V, Leblhuber F, Paulus W, Riederer P & Gerlach M. (1999). Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Res* **834**, 128-135.
- Bogerts B, Falkai P, Greve B, Schneider T & Pfeiffer U. (1993). The neuropathology of schizophrenia: past and present. *Journal fur Hirnforschung* **34**, 193-205.
- Boultadakis A & Pitsikas N. (2011). Anesthetic ketamine impairs rats' recall of previous information: the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methylester antagonizes this ketamine-induced recognition memory deficit. *Anesthesiology* **114**, 1345-1353.
- Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I & Bali L. (1978). Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* **15**, 339-343.
- Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS & Swerdlow NR. (2001a). Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophrenia research* **49**, 171-178.
- Braff DL, Geyer MA & Swerdlow NR. (2001b). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* **156**, 234-258.
- Bressan RA & Pilowsky LS. (2003a). Glutamatergic hypotesis of schizophrenia. *RevBrasPsiquiatr* **25**, 177-183.
- Bressan RA & Pilowsky LS. (2003b). Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Revista brasileira de psiquiatria* **25**, 177-183.
- Brooks-Kayal AR, Bath KG, Berg AT, Galanopoulou AS, Holmes GL, Jensen FE, Kanner AM, O'Brien TJ, Whittemore VH, Winawer MR, Patel M & Scharfman HE. (2013). Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Epilepsia* **54 Suppl 4**, 44-60.
- Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M & Hoschl C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 1014-1023.

- Bujas-Bobanovic M, Bird DC, Robertson HA & Dursun SM. (2000). Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* **130**, 1005-1012.
- Butler AR & Megson IL. (2002). Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chem Rev* **102**, 1155-1166.
- Campbell LF & Bedi KS. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiology & behavior* **45**, 883-890.
- Carreira BP, Santos DF, Santos AI, Carvalho CM & Araujo IM. (2015). Nitric Oxide Regulates Neurogenesis in the Hippocampus following Seizures. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2015**, 451512.
- Castellanos FX, Fine EJ, Kaysen D, Marsh WL, Rapoport JL & Hallett M. (1996). Sensorimotor gating in boys with Tourette's syndrome and ADHD: preliminary results. *Biol Psychiatry* **39**, 33-41.
- Castro GP, Medeiros DC, Guarnieri LO, Mourao FA, Pinto HP, Pereira GS & Moraes MF. (2015). Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy Behav.*
- Cavalheiro EA. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* **16**, 33-37.
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C & Turski L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* **32**, 778-782.
- Cavoy A, Ennaceur A & Delacour J. (1988). Effects of piracetam on learned helplessness in rats. *Physiology & behavior* **42**, 545-549.
- Celikyurt IK, Ulak G, Mutlu O, Akar FY, Erden F & Komsuoglu SS. (2012). Lamotrigine effects sensorimotor gating in WAG/Rij rats. *Journal of neurosciences in rural practice* **3**, 126-130.
- Chang YT, Chen PC, Tsai IJ, Sung FC, Chin ZN, Kuo HT, Tsai CH & Chou IC. (2011). Bidirectional relation between schizophrenia and epilepsy: a population-based retrospective cohort study. *Epilepsia* **52**, 2036-2042.
- Chartoff EH, Heusner CL & Palmiter RD. (2005). Dopamine is not required for the hyperlocomotor response to NMDA receptor antagonists. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1324-1333.
- Citrome L, Eramo A, Francois C, Duffy R, Legacy SN, Offord SJ, Krasa HB, Johnston SS, Guiraud-Diawara A, Kamat SA & Rohman P. (2015). Lack of tolerable treatment options for patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment* **11**, 3095-3104.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC & Zorumski CF. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* **23**, 953-968.
- Coras R, Pauli E, Li J, Schwarz M, Rossler K, Buchfelder M, Hamer H, Stefan H & Blumcke I. (2014). Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology* **137**, 1945-1957.

- Corssen G, Little SC & Tavakoli M. (1974). Ketamine and epilepsy. *Anesthesia and analgesia* **53**, 319-335.
- Corssen G, Miyasaka M & Domino EF. (1968). Changing concepts in pain control during surgery: dissociative anesthesia with CI-581. A progress report. *Anesthesia and analgesia* **47**, 746-759.
- Curran HV, D'Souza DC, Robbins TW & Fletcher P. (2009). Modelling psychosis. *Psychopharmacology (Berl)* **206**, 513-514.
- Da Silva RCB. (2006). Esquizofrenia: uma revisão. *Psicologia USP* **17**, 263-285.
- Dall'Olio R, Gandolfi O & Gaggi R. (2000). Blockade of the serotonergic system counteracts the dizocilpine-induced changes in dopaminergic function. *Behavioural pharmacology* **11**, 29-36.
- Davis PJ & Stewart KD. (2001). Interpretation of congruent and incongruent affective communications in paranoid schizophrenia. *Br J Clin Psychol* **40**, 249-259.
- Dawe GS, Hwang EH & Tan CH. (2009). Pathophysiology and animal models of schizophrenia. *Ann Acad Med Singapore* **38**, 425-426.
- Dawson VL & Dawson TM. (1996). Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* **10**, 179-190.
- De Castro EM, Ferreira RA & Goulart EMA. (2008). A epilepsia e os transtornos mentais: a interface neuropsiquiátrica. *Rev Med Minas Gerais* **4**, 98-106.
- De Leonibus E, Mele A, Oliverio A & Pert A. (2001). Locomotor activity induced by the non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801: role of nucleus accumbens efferent pathways. *Neuroscience* **104**, 105-116.
- De Oliveira J & Gouveia O. (2003). Transtornos psiquiátricos associados à epilepsia. *Rev Psiqu Clin* **5**, 160-164.
- De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J & Zugno AL. (2011). Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*, 69-77.
- Deakin JF, Lees J, McKie S, Hallak JE, Williams SR & Dursun SM. (2008). Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmacological magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* **65**, 154-164.
- Del-Bel EA, Oliveira PR, Oliveira JA, Mishra PK, Jobe PC & Garcia-Cairasco N. (1997). Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. *Braz J Med Biol Res* **30**, 971-979.
- 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.
- Dos Santos JG, Jr., Longo BM, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG & Mello LE. (2005). Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* **1066**, 37-48.

- Edeh J & Toone B. (1987). Relationship between interictal psychopathology and the type of epilepsy. Results of a survey in general practice. *Br J Psychiatry* **151**, 95-101.
- Engel J, Jr. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* **7**, 340-352.
- Ennaceur A & Delacour J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**, 47-59.
- Enomoto T & Floresco SB. (2009). Disruptions in spatial working memory, but not short-term memory, induced by repeated ketamine exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 668-675.
- Esplugues JV. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* **135**, 1079-1095.
- Fang Y & Wang X. (2015). Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus. *Seizure* **30**, 14-20.
- Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St Peter H & Olney JW. (1995). Age-specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade: potential relevance to schizophrenia? *Biol Psychiatry* **38**, 788-796.
- Feasey-Truger KJ, Kargl L & ten Bruggencate G. (1993). Differential effects of dentate kindling on working and reference spatial memory in the rat. *Neurosci Lett* **151**, 25-28.
- Feelisch M. (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**, 113-122.
- Flashman LA, Roth RM, Pixley HS, Cleavinger HB, McAllister TW, Vidaver R & Saykin AJ. (2007). Cavum septum pellucidum in schizophrenia: clinical and neuropsychological correlates. *Psychiatry research* **154**, 147-155.
- Fukatsu A, Hayashi T, Miyazaki-Akita A, Matsui-Hirai H, Furutate Y, Ishitsuka A, Hattori Y & Iguchi A. (2007). Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H790-797.
- Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JA & Garcia-Cairasco N. (2011). Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav* **20**, 257-266.
- Furtado Mde A, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F & Garcia-Cairasco N. (2002). Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia* **43 Suppl 5**, 37-39.
- Furtado RG, Coelho EB & NOBRE F. (2003). Urgências e emergências hipertensivas. *Medicina, Ribeirão Preto* **36**, 338-344.
- Gabriel C, Friguls B, Sureda FX, Pallas M, Planas AM, Escubedo E, Camarasa J & Camins A. (2000). Inhibitors of NO-synthase and donors of NO modulate kainic acid-induced damage in the rat hippocampus. *Journal of neuroscience research* **59**, 797-805.
- Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B & Tamminga CA. (2000). Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in

subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **157**, 1141-1149.

Georgieff N. (1995). *A Esquizofrenia*. Instituto Piaget. Lisboa

Geyer MA & Ellenbroek B. (2003). Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 1071-1079.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL & Swerdlow NR. (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* **156**, 117-154.

Gilman SC, Colton JS & Grossman Y. (1991). A 23187-stimulated calcium uptake and GABA release by cerebrocortical synaptosomes: effects of high pressure. *J Neural Transm Gen Sect* **86**, 1-9.

Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA & Jarskog LF. (2006). Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophrenia research* **81**, 47-63.

Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ & Williams GV. (2004). Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* **174**, 3-16.

Gomes TKC, Oliveira SL, Ataíde TR & Trindade EM. (2011). O papel da dieta cetogênica no estresse oxidativo presente na epilepsia experimental. *Journal of epilepsy and clinical neurophysiology* **2**, 54-64.

Gonzalez-Hernandez T, Garcia-Marin V, Perez-Delgado MM, Gonzalez-Gonzalez ML, Rancel-Torres N & Gonzalez-Feria L. (2000). Nitric oxide synthase expression in the cerebral cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia* **41**, 1259-1268.

Goulart BK, de Lima MN, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schroder N & Roesler R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* **167**, 969-973.

Gourgiotis I, Kampouri NG, Koulouri V, Lempesis IG, Prasinou MD, Georgiadou G & Pitsikas N. (2012). Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **102**, 507-514.

Grace AA. (2000). Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 330-341.

Greer SM, Trujillo AJ, Glover GH & Knutson B. (2014). Control of nucleus accumbens activity with neurofeedback. *NeuroImage* **96**, 237-244.

Guarnieri R, Hallak JEC, Walz R, Velasco TR, Alexandre VJ, Bustamante VC, Wichert L & Sakamoto AC. (2004). Tratamento farmacológico das psicoses na epilepsia. *Rev Bras Psiquiatria* **26**, 57-61.

Guerreiro CA, Jones-Gotman M, Andermann F, Bastos A & Cendes F. (2001). Severe Amnesia in Epilepsy: Causes, Anatomopsychological Considerations, and Treatment. *Epilepsy Behav* **2**, 224-246.

- Gunduz-Bruce H. (2009). The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev* **60**, 279-286.
- Hallak JE, Maia-de-Oliveira JP, Abrao J, Evora PR, Zuardi AW, Crippa JA, Belmonte-de-Abreu P, Baker GB & Dursun SM. (2013). Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA psychiatry* **70**, 668-676.
- Hallak JEC. (2009). Perguntas & Respostas: Esquizofrenia Revista Veja.
- Harrison DG & Bates JN. (1993). The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* **87**, 1461-1467.
- Harrison PJ. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain : a journal of neurology* **122 (Pt 4)**, 593-624.
- Harvey PD, Green MF, Bowie C & Loebel A. (2006). The dimensions of clinical and cognitive change in schizophrenia: evidence for independence of improvements. *Psychopharmacology (Berl)* **187**, 356-363.
- Herold CJ, Lasser MM, Schmid LA, Seidl U, Kong L, Fellhauer I, Thomann PA, Essig M & Schroder J. (2013). Hippocampal volume reduction and autobiographical memory deficits in chronic schizophrenia. *Psychiatry research* **211**, 189-194.
- Hetem LA, Danion JM, Diemunsch P & Brandt C. (2000). Effect of a subanesthetic dose of ketamine on memory and conscious awareness in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* **152**, 283-288.
- Hitti FL & Siegelbaum SA. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* **508**, 88-92.
- Hoenig K, Hochrein A, Quednow BB, Maier W & Wagner M. (2005). Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* **57**, 1153-1158.
- Hoffman HS & Ison JR. (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychological review* **87**, 175-189.
- Howland JG, MacKenzie EM, Yim TT, Taepavarapruk P & Phillips AG. (2004). Electrical stimulation of the hippocampus disrupts prepulse inhibition in rats: frequency- and site-dependent effects. *Behav Brain Res* **152**, 187-197.
- Ignarro LJ. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* **41**, 485-490.
- Issy AC, Pedrazzi JF, Yoneyama BH & Del-Bel EA. (2014). Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 663-672.
- Issy AC, Salum C & Del Bel EA. (2009). Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. *Behav Brain Res* **205**, 475-481.
- Jarrard LE. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and neural biology* **60**, 9-26.

- Javitt DC. (2007). Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol* **78**, 69-108.
- Javitt DC. (2009). When doors of perception close: bottom-up models of disrupted cognition in schizophrenia. *Annual review of clinical psychology* **5**, 249-275.
- Jentsch JD & Roth RH. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **20**, 201-225.
- Jeste DV & Lohr JB. (1989). Hippocampal pathologic findings in schizophrenia. A morphometric study. *Arch Gen Psychiatry* **46**, 1019-1024.
- Jones CA, Watson DJ & Fone KC. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol* **164**, 1162-1194.
- Jonsson SA, Luts A, Guldberg-Kjaer N & Brun A. (1997). Hippocampal pyramidal cell disarray correlates negatively to cell number: implications for the pathogenesis of schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **247**, 120-127.
- Kandratavicius L. (2007). Caracterização neuropatológica da sintase neuronal de óxido nítrico e das proteínas de choque térmico 70 e 90 na epilepsia do lobo temporal associada ou não a comorbidades psiquiátricas. In *Neurologia*, pp. 103. Universidade de São Paulo.
- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS & Leite JP. (2014a). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatric disease and treatment* **10**, 1693-1705.
- Kandratavicius L, Balista PA, Wolf DC, Abrao J, Evora PR, Rodrigues AJ, Chaves C, Maia-de-Oliveira JP, Leite JP, Dursun SM, Baker G, Guimaraes FS & Hallak JE. (2014b). Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. *BMC Neuroscience*.
- Kandratavicius L, Hallak JE, Carlotti CG, Jr., Assirati JA, Jr. & Leite JP. (2014c). Hippocampal expression of heat shock proteins in mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities and their relation to seizure outcome. *Epilepsia* **55**, 1834-1843.
- Kandratavicius L, Hallak JE & Leite JP. (2014d). What are the similarities and differences between schizophrenia and schizophrenia-like psychosis of epilepsy? A neuropathological approach to the understanding of schizophrenia spectrum and epilepsy. *Epilepsy Behav* **38C**, 143-147.
- Kandratavicius L, Hallak JE, Young LT, Assirati JA, Carlotti CG, Jr. & Leite JP. (2012a). Differential aberrant sprouting in temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities. *Psychiatry research* **195**, 144-150.
- Kandratavicius L, Hallak JEC & Leite JP. (2007). Psicose e Depressão na Epilepsia do Lobo Temporal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* **4**, 163-167.
- Kandratavicius L, Lopes-Aguiar C, Bueno-Junior LS, Romcy-Pereira RN, Hallak JEC & Leite JP. (2012b). Psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy: possible relationships between psychotic disorders and involvement of limbic circuits. *Rev Bras Psiquiatr in press*.

- Kapur S, Mizrahi R & Li M. (2005). From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis. *Schizophrenia research* **79**, 59-68.
- Kawakami S, Ichikawa M, Yokosuka M, Tsukamura H & Maeda K. (1998). Glial and neuronal localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the median eminence of female rats. *Brain Res* **789**, 322-326.
- Kayama Y & Iwama K. (1972). The EEG, evoked potentials, and single-unit activity during ketamine anesthesia in cats. *Anesthesiology* **36**, 316-328.
- Keefe RSE & Nadel L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G & Bernstein HG. (2004a). Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience* **126**, 591-598.
- Keilhoff G, Bernstein HG, Becker A, Grecksch G & Wolf G. (2004b). Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **56**, 317-322.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W & Holzmüller B. (1980). Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* **20**, 379-382.
- Kiss JP & Vizi ES. (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* **24**, 211-215.
- Klamer D, Engel JA & Svensson L. (2004). The neuronal selective nitric oxide synthase inhibitor, Nomega-propyl-L-arginine, blocks the effects of phencyclidine on prepulse inhibition and locomotor activity in mice. *European journal of pharmacology* **503**, 103-107.
- Korotkova T, Fuchs EC, Ponomarenko A, von Engelhardt J & Monyer H. (2010). NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. *Neuron* **68**, 557-569.
- Labbate GP, da Silva AV & Barbosa-Silva RC. (2014). Effect of severe neonatal seizures on prepulse inhibition and hippocampal volume of rats tested in early adulthood. *Neurosci Lett* **568**, 62-66.
- Lauer M, Senitz D & Beckmann H. (2001). Increased volume of the nucleus accumbens in schizophrenia. *Journal of neural transmission* **108**, 645-660.
- Leite JP, Bortolotto ZA & Cavalheiro EA. (1990a). Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* **14**, 511-517.
- Leite JP & Cavalheiro EA. (1995). Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Res* **20**, 93-104.
- Leite JP, Chimelli L, Terra-Bustamante VC, Costa ET, Assirati JA, de Nucci G & Martins AR. (2002a). Loss and sprouting of nitric oxide synthase neurons in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* **43 Suppl 5**, 235-242.

- Leite JP, Garcia-Cairasco N & Cavalheiro EA. (2002b). New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* **50**, 93-103.
- Leite JP, Nakamura EM, Lemos T, Masur J & Cavalheiro EA. (1990b). Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res* **23**, 681-683.
- Lewis DA & Lieberman JA. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* **28**, 325-334.
- Liddle PF. (1992). PET scanning and schizophrenia--what progress? *Psychol Med* **22**, 557-560.
- Lincoln TM, Dey NB, Boerth NJ, Cornwell TL & Soff GA. (1998). Nitric oxide--cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases. *Acta Physiol Scand* **164**, 507-515.
- Lindfors N, Barati S & O'Connor WT. (1997). Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Res* **759**, 205-212.
- Lipska BK. (2004). Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 282-286.
- Lodge DJ & Grace AA. (2011). Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 507-513.
- Loiacono RE & Beart PM. (1992). Hippocampal lesions induced by microinjection of the nitric oxide donor nitroprusside. *European journal of pharmacology* **216**, 331-333.
- Loscher W & Brandt C. (2010). Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* **62**, 668-700.
- Maia-de-Oliveira JP, Belmonte-de-Abreu P, Bressan RA, Cachoeira C, Baker GB, Dursun SM & Hallak JE. (2014a). Sodium nitroprusside treatment of clozapine-refractory schizophrenia. *Journal of clinical psychopharmacology* **34**, 761-763.
- Maia-de-Oliveira JP, Lobao-Soares B, Baker GB, Dursun SM & Hallak JE. (2014b). Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor for novel treatment of schizophrenia, may also modulate dopaminergic systems. *Schizophrenia research* **159**, 558-559.
- Marangoz AH, Yildirim M, Ayyildiz M & Marangoz C. (2012). The interactions of nitric oxide and acetylcholine on penicillin-induced epilepsy in rats. *Neurochemical research* **37**, 1465-1474.
- Marchetti RL, De Castro APW, Kurciant D, Cremonese E & Gallucci JN. (2005). Transtornos mentais associados à epilepsia. *Rev Psiq Clin* **3**, 170-182.
- Marcotte ER, Pearson DM & Srivastava LK. (2001). Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci* **26**, 395-410.
- Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD & Leite JP. (2002). Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* **135**, 237-251.

- Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM & Kuhlman PA. (1996). The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* **26**, 151-161.
- Matos G, Guarniero FB, Hallak JE & Bressan RA. (2015). Schizophrenia, the forgotten disorder: the scenario in Brazil. *Revista brasileira de psiquiatria* **37**, 269-270.
- Mayer B & Hemmens B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **22**, 477-481.
- McCarthy DA, Chen G, Kaump DH & Ensor C. (1965). General Anesthetic and Other Pharmacological Properties of 2-(O-Chlorophenyl)-2-Methylamino Cyclohexanone Hcl (Ci-581). *The Journal of new drugs* **5**, 21-33.
- Medina-Ceja L, Pardo-Pena K & Ventura-Mejia C. (2014). Evaluation of behavioral parameters and mortality in a model of temporal lobe epilepsy induced by intracerebroventricular pilocarpine administration. *Neuroreport*.
- Meldrum BS & Brierley JB. (1973). Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. *Arch Neurol* **28**, 10-17.
- Mello LE & Covolan L. (1996). Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res* **26**, 123-129.
- Mitchell SN, Yee BK, Feldon J, Gray JA & Rawlins JN. (2000). Activation of the retrohippocampal region in the rat causes dopamine release in the nucleus accumbens: disruption by fornix section. *European journal of pharmacology* **407**, 131-138.
- Modai S & Shomron N. (2016). Molecular Risk Factors for Schizophrenia. *Trends in molecular medicine*.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A & Daly D. (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 2921-2927.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- Morgan CJ, Mofeez A, Brandner B, Bromley L & Curran HV. (2004). Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* **29**, 208-218.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN & O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681-683.
- Mula M. (2016). The pharmacological management of psychiatric comorbidities in patients with epilepsy. *Pharmacological research* **107**, 147-153.
- Muller CJ, Groticke I, Bankstahl M & Loscher W. (2009). Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Experimental neurology* **219**, 284-297.

- Muller RU, Kubie JL & Ranck JB, Jr. (1987). Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **7**, 1935-1950.
- Mulsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Kruger J & Olesen SP. (1994). Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport* **5**, 2325-2328.
- Mumby DG, Tremblay A, Lecluse V & Lehmann H. (2005). Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* **15**, 1050-1056.
- Nakken KO, Refsland G, Lillestolen KM & Solaas MH. (2005). [Seizure-precipitating factors in epilepsy--what do patients report?]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* **125**, 2172-2174.
- Napoli C & Ignarro LJ. (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 97-123.
- Nathan C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**, 3051-3064.
- Nathan C & Xie QW. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**, 13725-13728.
- Newcomer JW, Craft S, Fucetola R, Moldin SO, Selke G, Paras L & Miller R. (1999). Glucose-induced increase in memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* **25**, 321-335.
- Nikiforuk A, Holuj M, Kos T & Popik P. (2016). The effects of a 5-HT receptor antagonist in a ketamine-based rat model of cognitive dysfunction and the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology* **105**, 351-360.
- Noh HS, Kim DW, Cho GJ, Choi WS & Kang SS. (2006). Increased nitric oxide caused by the ketogenic diet reduces the onset time of kainic acid-induced seizures in ICR mice. *Brain Res* **1075**, 193-200.
- Olney JW & Farber NB. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **52**, 998-1007.
- Olney JW, Newcomer JW & Farber NB. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* **33**, 523-533.
- Olney JW, Rhee V & Ho OL. (1974). Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* **77**, 507-512.
- Olton DS & Samuelson RJ. (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavioral Processes* **2**, 97-116.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M & Topple A. (1985). Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* **13**, 139-143.

- Pearson JN, Schulz KM & Patel M. (2014). Specific alterations in the performance of learning and memory tasks in models of chemoconvulsant-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* **108**, 1032-1040.
- Persinger MA, Makarec K & Bradley JC. (1988). Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiology & behavior* **44**, 27-37.
- Piskorowski RA, Nasrallah K, Diamantopoulou A, Mukai J, Hassan SI, Siegelbaum SA, Gogos JA & Chevalleyre V. (2016). Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron* **89**, 163-176.
- Pitkanen A, Schwartzkroin PA & Moshe SL. (2006). *The models of seizures and epilepsy*. Elsevier.
- Pitsikas N. (2015). The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications. *European journal of pharmacology* **766**, 106-113.
- Pouretmad HR, Thompson PJ & Fenwick PB. (1998). Impaired sensorimotor gating in patients with non-epileptic seizures. *Epilepsy Res* **31**, 1-12.
- Prast H & Philippu A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in neurobiology* **64**, 51-68.
- Proctor MR, Fornai F, Afshar JK & Gale K. (1997). The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. *Neuroscience* **76**, 1231-1236.
- Quirk GJ, Muller RU & Kubie JL. (1990). The firing of hippocampal place cells in the dark depends on the rat's recent experience. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10**, 2008-2017.
- Racine R, Okujava V & Chipashvili S. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 295-299.
- Ram E, Raphaeli S & Avital A. (2013). Prepubertal chronic stress and ketamine administration to rats as a neurodevelopmental model of schizophrenia symptomatology. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **16**, 2307-2314.
- Ramirez J, Garnica R, Boll MC, Montes S & Rios C. (2004). Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophrenia research* **68**, 357-361.
- Razoux F, Garcia R & Lena I. (2007). Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* **32**, 719-727.
- Rich AM, Cho YT, Tang Y, Savic A, Krystal JH, Wang F, Xu K & Anticevic A. (2016). Amygdala volume is reduced in early course schizophrenia. *Psychiatry research* **250**, 50-60.
- Salgado JV, Hetem LA & Sandner G. (2006). [Experimental models of schizophrenia--a review]. *Revista brasileira de psiquiatria* **28**, 135-141.

- Salum C, Pereira ACCI & Guimarães EADBB. (2008). Dopamina, óxido nítrico e suas interações em modelos para o estudo da esquizofrenia. *Scielo - Psicologia:reflexão e crítica* **21**, 186-194.
- Schiorring E. (1979). An open field study of stereotyped locomotor activity in amphetamine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)* **66**, 281-287.
- Schultz CC, Koch K, Wagner G, Roebel M, Schachtzabel C, Nenadic I, Albrecht C, Reichenbach JR, Sauer H & Schlosser RG. (2010). Psychopathological correlates of the entorhinal cortical shape in schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **260**, 351-358.
- Segal DS & Mandell AJ. (1974). Long-term administration of d-amphetamine: progressive augmentation of motor activity and stereotypy. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2**, 249-255.
- Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL & Snyder PW. (2007). Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol* **35**, 984-999.
- Shim S, Shuman M & Duncan E. (2015). An emerging role of cGMP in the treatment of schizophrenia: A review. *Schizophrenia research*.
- Snyder SH & Bredt DS. (1991). Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 125-128.
- Snyder SH & Ferris CD. (2000). Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry* **157**, 1738-1751.
- Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL & Holmes GL. (1993). Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* **34**, 420-432.
- Stanarius A, Seidel B & Wolf G. (1998). Neuronal nitric oxide synthase in the vasculature of the rat brain: an immunocytochemical study using the tyramide signal amplification technique. *Journal of neurocytology* **27**, 731-736.
- Steeds H, Carhart-Harris RL & Stone JM. (2015). Drug models of schizophrenia. *Therapeutic advances in psychopharmacology* **5**, 43-58.
- Stewart LS & Leung LS. (2003). Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. *Epilepsy Behav* **4**, 153-160.
- Stone JM, Dietrich C, Edden R, Mehta MA, De Simoni S, Reed LJ, Krystal JH, Nutt D & Barker GJ. (2012). Ketamine effects on brain GABA and glutamate levels with 1H-MRS: relationship to ketamine-induced psychopathology. *Molecular psychiatry* **17**, 664-665.
- Suckling J, Roberts H, Walker M, Highley JR, Fenwick P, Oxbury J & Esiri MM. (2000). Temporal lobe epilepsy with and without psychosis: exploration of hippocampal pathology including that in subpopulations of neurons defined by their content of immunoreactive calcium-binding proteins. *Acta neuropathologica* **99**, 547-554.
- Sumiyoshi T, Tsunoda M, Uehara T, Tanaka K, Itoh H, Sumiyoshi C & Kurachi M. (2004). Enhanced locomotor activity in rats with excitotoxic lesions of the entorhinal cortex, a

- neurodevelopmental animal model of schizophrenia: behavioral and in vivo microdialysis studies. *Neurosci Lett* **364**, 124-129.
- Swerdlow NR. (2010). Integrative circuit models and their implications for the pathophysiologies and treatments of the schizophrenias. *Current topics in behavioral neurosciences* **4**, 555-583.
- Swerdlow NR, Geyer MA & Braff DL. (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* **156**, 194-215.
- Swerdlow NR, Paulsen J, Braff DL, Butters N, Geyer MA & Swenson MR. (1995). Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **58**, 192-200.
- Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA & Braff DL. (2008). Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)* **199**, 331-388.
- Takahashi H, Iwase M, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Iike N, Yamamori H, Nakahachi T, Ikezawa K, Azechi M, Canuet L, Ishii R, Kazui H, Hashimoto R & Takeda M. Relationship of prepulse inhibition to temperament and character in healthy Japanese subjects. *Neurosci Res* **72**, 187-193.
- Tandon R, Keshavan MS & Nasrallah HA. (2008). Schizophrenia, "Just the Facts": what we know in 2008 part 1: overview. *Schizophrenia research* **100**, 4-19.
- Tandon R, Nasrallah HA & Keshavan MS. (2009). Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia research* **110**, 1-23.
- Tay-Teo K, Pezzullo L, Violin BB, Sardi P, Delatorre RM, Pititto L & Guarniero F. (2014). The potential benefits of long-acting atypical antipsychotic injections in preventing relapse in Brazil. In *ISPOR 17th Annual European Congress*. Amsterdam RAI.
- Thatcher GR, Bennett BM & Reynolds JN. (2005). Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* **2**, 171-182.
- Trevlopoulou A, Touzlatzi N & Pitsikas N. (2016). The nitric oxide donor sodium nitroprusside attenuates recognition memory deficits and social withdrawal produced by the NMDA receptor antagonist ketamine and induces anxiolytic-like behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **233**, 1045-1054.
- Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA & Cavalheiro EA. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* **3**, 154-171.
- Van Leeuwen R, De Vries R & Dzoljic MR. (1995). 7-Nitro indazole, an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, attenuates pilocarpine-induced seizures. *European journal of pharmacology* **287**, 211-213.
- Vasconcelos SMM, Andrade MM, Soares PM, Chaves BG, Patrocionio MC, Souza FCF & Macêdo DS. (2005). Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. *RevPsiClin* **32**, 10-16.

- Vilhena FSDF. (2006). Mecanismos de nitrosilação de ferro-porfirinas por SNAP: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbio. *Tese de Doutorado em Física pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC)* -.
- Viskontas IV, McAndrews MP & Moscovitch M. (2000). Remote episodic memory deficits in patients with unilateral temporal lobe epilepsy and excisions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 5853-5857.
- Watson DR, Bai F, Barrett SL, Turkington A, Rushe TM, Mulholland CC & Cooper SJ. (2012). Structural changes in the hippocampus and amygdala at first episode of psychosis. *Brain imaging and behavior* **6**, 49-60.
- Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, Engelmann M, Singewald N, Lubec G & Lubec B. (2004). Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **10**, 130-140.
- West AR, Galloway MP & Grace AA. (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse* **44**, 227-245.
- Wiley JL, Golden KM & Bowen SE. (1997). Effects of modulation of nitric oxide on acoustic startle responding and prepulse inhibition in rats. *European journal of pharmacology* **328**, 125-130.
- Williams PA, Hellier JL, White AM, Staley KJ & Dudek FE. (2007). Development of spontaneous seizures after experimental status epilepticus: implications for understanding epileptogenesis. *Epilepsia* **48 Suppl 5**, 157-163.
- Winters BD & Bussey TJ. (2005). Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 4243-4251.
- Wolf DC, Bueno-Junior LS, Lopes-Aguiar C, Do Val Da Silva RA, Kandratavicius L & Leite JP. (2016). The frequency of spontaneous seizures in rats correlates with alterations in sensorimotor gating, spatial working memory, and parvalbumin expression throughout limbic regions. *Neuroscience* **312**, 86-98.
- Womer FY, Wang L, Alpert KI, Smith MJ, Csernansky JG, Barch DM & Mamah D. (2014). Basal ganglia and thalamic morphology in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry research* **223**, 75-83.
- Xu Z, Tong C & Eisenach JC. (1996). Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. *Anesthesiology* **85**, 107-111.
- Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H & Nabeshima T. (1996). The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **276**, 460-466.
- Yu SY, Gao R, Zhang L, Luo J, Jiang H & Wang S. (2013a). Curcumin ameliorates ethanol-induced memory deficits and enhanced brain nitric oxide synthase activity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **44**, 210-216.

- Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Shao Y & Li G. (2013b). Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **45**, 47-53.
- Zhang J & Snyder SH. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 213-233.
- Zhou FW, Rani A, Martinez-Diaz H, Foster TC & Roper SN. (2011). Altered behavior in experimental cortical dysplasia. *Epilepsia* **52**, 2293-2303.
- Zou LB, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T & Nabeshima T. (1998). Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology* **37**, 323-330.

ANEXO I: ARTIGOS PUBLICADOS

Animal models of epilepsy: use and limitations

Ludmyla Kandratavicius¹
Priscila Alves Balista¹
Cleiton Lopes-Aguiar¹
Rafael Naime Ruggiero¹
Eduardo Henrique Umeoka²
Norberto Garcia-Cairasco²
Lezio Soares Bueno-Junior¹
Joao Pereira Leite¹

¹Department of Neurosciences and Behavior, ²Department of Physiology, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

Abstract: Epilepsy is a chronic neurological condition characterized by recurrent seizures that affects millions of people worldwide. Comprehension of the complex mechanisms underlying epileptogenesis and seizure generation in temporal lobe epilepsy and other forms of epilepsy cannot be fully acquired in clinical studies with humans. As a result, the use of appropriate animal models is essential. Some of these models replicate the natural history of symptomatic focal epilepsy with an initial epileptogenic insult, which is followed by an apparent latent period and by a subsequent period of chronic spontaneous seizures. Seizures are a combination of electrical and behavioral events that are able to induce chemical, molecular, and anatomic alterations. In this review, we summarize the most frequently used models of chronic epilepsy and models of acute seizures induced by chemoconvulsants, traumatic brain injury, and electrical or sound stimuli. Genetic models of absence seizures and models of seizures and status epilepticus in the immature brain were also examined. Major uses and limitations were highlighted, and neuropathological, behavioral, and neurophysiological similarities and differences between the model and the human equivalent were considered. The quest for seizure mechanisms can provide insights into overall brain functions and consciousness, and animal models of epilepsy will continue to promote the progress of both epilepsy and neurophysiology research.

Keywords: epilepsy, animal model, pilocarpine, kindling, neurodevelopment

Introduction

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of epilepsy in humans, in which seizures spread to neighboring cortices and hippocampal neuron loss and other neuropathological changes may take place.^{1,2} Comprehension of complex mechanisms underlying epileptogenesis and seizure generation in TLE and other forms of epilepsy cannot be fully acquired in clinical studies with humans. As a result, the use of appropriate animal models is essential. In the present review, we summarize some of the most frequently used rodent animal models of TLE and other epileptic disorders, highlighting induction methods and manifestations as well as major uses and limitations.

Chemoconvulsants

Rodents with spontaneous recurrent seizures have been generated by using chemoconvulsants, primarily pilocarpine and kainic acid.³ Usually, these models intend to mimic TLE, and therefore rodents must display a similar “clinical history” as the human counterpart, including an initial precipitant injury afflicting the hippocampus and/or the temporal lobe (eg, status epilepticus [SE]), a latent period between the injury and the occurrence of spontaneous seizures, chronic manifestation of spontaneous seizures (usually partial and tonic-clonic seizures), and histopathological changes deemed characteristic of TLE.^{2,4,5} Unfortunately, animal models of chronic epilepsy are not widely used because of time constraints and costs.

Correspondence: Ludmyla Kandratavicius
Department of Neurosciences and Behavior, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Av Bandeirantes 3900, CEP 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil
Tel +55 16 3602 2796
Fax +55 16 3633 0866
Email ludykandra@gmail.com

Kainic acid was one of the first compounds used to model TLE in rodents.⁶ It is an L-glutamate analog, the systemic or intracerebral administration of which causes neuronal depolarization and seizures, preferentially targeting the hippocampus.⁷ Injected rodents show recurrent seizures, usually secondarily generalized and of variable frequency, with remarkable histopathological correlates of hippocampal sclerosis.⁸ Kainic acid has the advantage of causing habitually hippocampus-restricted injuries, unlike pilocarpine, which can also produce lesions in neocortical areas.⁶ Nevertheless, extrahippocampal areas are also significantly compromised in human TLE,⁹ making pilocarpine another useful chemoconvulsant.

Pilocarpine is a muscarinic acetylcholine receptor agonist. Systemic or intracerebral injection of pilocarpine causes seizures that build up into a limbic SE.^{10,11} Structural damages and subsequent development of spontaneous recurrent seizures resemble those of human complex partial seizures.¹² In fact, antiepileptic drugs (AEDs) that are effective against complex partial seizures in humans can also halt spontaneous seizures in the pilocarpine model.¹³ In addition, there are several network and neurochemical similarities between human TLE and the pilocarpine model. For instance, the subiculum can generate interictal activity in both the human TLE¹⁴ and the pilocarpine model.¹⁵ Neurotrophins are upregulated in the hippocampus of mesial TLE patients,¹⁶ as well as in the hippocampus and neocortex of pilocarpine-treated rats.¹⁷ Cognitive and memory deficits commonly found in TLE patients^{18,19} are also present in pilocarpine-injected rats.^{20,21}

Other compounds such as pentylenetetrazol (PTZ), strychnine, N-methyl-D,L-aspartate, tetanus toxin, and penicillin are widely used as acute seizure models, and not as animal models of epilepsy. The difference is that seizure models may be useful for rapid screening of AED action, but they do not necessarily result in chronic epilepsy, with the exception of tetanus toxin,²² and probably of repeated penicillin injections.²³ Crude extract of the star fruit and its active compound caramboxin are also potent chemoconvulsants and are capable of inducing SE,²⁴ but it remains to be described whether they also result in later spontaneous recurrent seizures, as in chronic models. Compounds that trigger seizures can be used on testing different AEDs that would act on different seizure types. For instance, strychnine and N-methyl-D,L-aspartate produce generalized tonic-clonic seizures, as well as PTZ nonconvulsive absence or myoclonic seizures.²⁵ Ethosuximide, trimethadione, valproate, and other clinically efficacious drugs have been discovered by using seizure models.²⁶ However, drugs such as levetiracetam,

vigabatrin, and tiagabine, which act on mechanisms other than sodium channel blockade, were discovered in models that predict drug efficacy against partial seizures²⁷ (eg, those seen in chronic TLE models or full electrical kindling).

In summary, face validity (the extent to which the animal model reproduces the symptoms and phenotypes associated with the human disease) of chemoconvulsants that result in chronic epilepsy is relatively high, as they reproduce most of neuropathological findings, as well as the behavioral, cognitive, and psychiatric symptoms of TLE. However, none of these models are completely clinically validated, as they are not predictive of clinical response to all therapeutic strategies. The choice of a given model should, therefore, rely on which group of specific features one is aiming to study.

Chemoconvulsants in the immature brain

SE has a special propensity to develop in the immature brain, with about 50% of the cases occurring in children younger than 2 years old.^{5,28} Clinical studies point out that 13%–74% of children who suffered a convulsive SE developed epilepsy.²⁹ Furthermore, SE during development is often associated with hippocampal injury and mesial temporal sclerosis, as well neurological, cognitive, and behavioral impairments. Thus, animal models of SE are important for investigating whether SE can result in maladaptive neuronal reorganization, epileptogenesis, and cognitive impairment.³⁰

SE in the developing brain is modeled in immature rodents (younger than 21 postnatal days [$<P21$]) mainly by kainic acid and pilocarpine administration. Administration protocol is similar to that used in adult rodents, except that young ones have enhanced susceptibility to seizure induction, thus requiring smaller doses.^{31,32} In both models, seizure manifestation becomes more evident with age progression.³¹ In addition, kainic acid excitotoxicity is higher in older animals,³³ as are severity and duration of SE.³⁰ In rats older than P7, SE induced by pilocarpine or kainic acid ceases exploratory activity, and animals develop scratching, body tremors, chewing, clonic movements of the forelimbs, and head bobbing before progressing into tonic and clonic activity.³⁰

Rodents submitted to SE during development show minimal or no detectable cellular damage in adulthood.^{34,35} However, studies on the acute and short-term effects of SE indicate neuronal injury in the hippocampus, amygdala, and mediodorsal nucleus of thalamus.^{36,37} Mossy fiber sprouting is also present in immature SE models using kainic acid and pilocarpine, although young rats do not exhibit the prominent reorganization that is typically observed in the adult ones.^{34,35}

Recently, Kubová and Mareš³⁸ showed that pilocarpine induction of SE at P12 and P25 led to cognitive impairments and that the magnitude of such impairments increased with age. Interestingly, cognitive deficits correlated with the severity of tissue damage, but not with seizure parameters.

Multiple administrations of PTZ or flurothyl are also used to mimic recurrent generalized tonic-clonic seizures in immature rodents.³² Flurothyl is a volatile, fast-acting central nervous system stimulant that causes seizures with myoclonic jerks followed by forelimb clonus, wild running, loss of posture, and severe tonic posturing.³² Recovery is very fast, and the animals exhibit normal behavior within 30 minutes. Seizures are commonly induced five times a day over the course of 5–10 days (usually P0–P9) with intervals of at least 2 hours.³⁹ In the PTZ model, seizures are commonly induced by a single systemic administration, and PTZ can even induce SE if given in a sufficient amount.^{32,40} Seizure-related behaviors are also age-dependent. Compared with P18, P28, and adult rats, P10 animals injected with PTZ have shorter latency to generalized tonic-clonic seizures.⁴¹

No evident neuron loss is seen in rodents submitted to flurothyl or PTZ recurrent seizures during development.^{42–44} However, mossy fiber sprouting occurs in adult animals.^{39,40,43} Extratemporal areas can also be affected, including increased prefrontal cortex thickness, synaptic plasticity alterations, and decreased behavioral flexibility.^{45,46} These data indicate substantial changes in prefrontal cortex function, which may be an important substrate of cognitive deficits in humans with a history of infant or juvenile seizures.⁴⁵ Rodents submitted to early-life flurothyl recurrent seizures present with increased seizure susceptibility when they are adults.^{39,42} However, as a limitation of this model, adult animals do not present with spontaneous seizures.

Electrical stimulation

Animal models of seizures induced by electrical stimulation convey the advantage of reproducing epileptogenic features in the intact brain with low mortality and high reproducibility. Moreover, unlike chemical-induced seizures, postictal alterations from electrical stimulation can be investigated when the epileptogenic cause is no longer present. However, seizure modeling by electrical stimulation does not provide cell-type specificity in the brain. In addition, stimulation protocols can be costly and laborious when used for chronic studies.³²

Electroshock-induced seizures

Electroshock-induced seizures (ES) are among the most studied models of electrical stimulation. Electroshock is

conveniently applied a single time and does not require the stereotaxic implant of electrodes. It involves whole-brain stimulation protocols (eg, 6 Hz in mice and 50–60 Hz in rats) and may be divided into minimal ES and maximal ES. Minimal ES are a putative model of myoclonic seizures and can be induced with current stimulation through corneal electrodes. In this case, the epileptiform activity is usually more prominent in the forebrain and is associated with minimal clonic behavioral seizures.⁴⁷ Minimal ES may become generalized if stimulation intensity is increased.⁴⁸ In turn, maximal ES induction has been useful when modeling generalized tonic-clonic seizures. It is mostly associated with hindbrain seizures and can be generated by auricular stimulation at threshold current intensities.⁴⁹ Maximal ES and PTZ seizure models have been largely employed for AED screening. However, AEDs that protect against partial and nonconvulsive seizures in epileptic patients failed to do so in the maximal ES and PTZ models, respectively.²⁶ Therefore, a battery of models is required during the development of AEDs. ES models have also been employed to examine modifications of intracellular cascades and/or posttranslational modifications of proteins to clarify how epileptiform activities relate to synaptic plasticity dysfunctions, cognitive deficits, and psychiatric comorbidities.^{50–52} For instance, Tsankova et al⁵¹ demonstrated that chromatin remodeling is involved in ES-induced regulation of c-fos and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Afterdischarges

The single-evoked epileptic afterdischarges model (AD) is another important approach to electrical stimulation. It is induced in specific brain regions, resembling complex partial seizures if applied into limbic structures and myoclonic seizures if applied into the sensorimotor cortex. AD is useful for investigating electrophysiological and behavioral correlates of focally generated seizure-like patterns that often spread to nonstimulated networks.^{53,54} Electrographic properties of AD largely depend on the brain region stimulated. For instance, spike-and-wave patterns can be elicited by AD induction either in the neocortex or mediodorsal thalamus. In contrast, AD induction in limbic circuits produces fast spikes, large delta waves, and/or sharp theta waves.^{55,56} The most common target for electrically induced AD is the hippocampus.^{56,57} Once hippocampal AD ends, postictal refractoriness, which precludes subsequent seizures, is often observed.⁵⁴ This period is followed by a pattern of low-amplitude and fast oscillations (40–80 Hz), also defined as the AD termination oscillation.⁵⁸ Behavioral alterations induced by hippocampal

AD include freezing during stimulus, wet dog shake at the end or just after the stimulus, and hyperlocomotion and stereotypies (eg, excessive grooming, rearing, and/or head movements), along with the AD termination oscillations.^{54,57} Some authors claim that AD experiments can probe underlying mechanisms of the relationship between psychosis and epilepsy (eg, postictal psychosis).^{59,60} In fact, it has been reported that hippocampal AD induction enhances gamma oscillations in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex and that such an effect is associated with hyperlocomotion and stereotypies.^{55,59,61,62} These alterations can be reversed by treatment with the typical antipsychotic haloperidol.⁶¹ As a consequence, hippocampal AD produces sensorimotor gating deficits, measured by prepulse inhibition of the acoustic startle 2 minutes after electrical stimulation.^{60,61} To date, Osawa et al⁶³ were the first group to report the benefit of using optogenetics⁶⁴ to probe hippocampal AD. The authors were able to overcome some technical limitations of the electrical stimulation; namely, the inability to manipulate the activity of specific groups of neurons and the unfeasibility of studying the spatial–temporal dynamics of neuronal activity during stimulation because of contamination of the electrophysiological recordings by electrical artifacts.⁶³ In addition to developing an electrical artifact-free model of AD, the authors provide further understanding of the generation and termination of seizure-like activity in the septo-temporal axis of the hippocampus.

Kindling

At this time, kindling is the most studied model of electrical stimulation. Kindling refers to a seizure-induced plasticity phenomenon that occurs when repeated AD induction by electrical stimulation in a specific brain region evokes a progressive enhancement of seizure susceptibility. Ultimately, it culminates in emergence of spontaneous seizures and the establishment of a permanent epileptic state.⁶⁵ Initially, behavioral alterations during ADs resemble partial seizures (classes 1–3),⁶⁶ which evolve into secondary generalization (classes 4–5).⁶⁷ Although a fully kindled state is established after 90–100 class 5 seizures,⁶⁸ it is also possible to induce spontaneous behavioral seizures and focal hippocampal injury by milder protocols, as demonstrated by the continuous perforant pathway stimulation protocol.⁶⁹ Because kindling produces a fairly robust and reproducible sequence of molecular and cellular alterations in neural circuits, it has been considered a potent tool for probing epileptogenesis mechanisms.^{70,71} In this sense, there is a body of evidence suggesting that kindling is not merely a chronic model of

epilepsy but, rather, a relevant neurobiological phenomenon for understanding the consequences of poorly controlled seizures.^{70,72} Unfortunately, kindling is a costly and time-consuming procedure comprising long periods of handling and stimulation procedures, not to mention the risk of losing or damaging the chronic implants.³² These technical limitations might explain the lack of studies on the chronic stage of spontaneous seizures induced by kindling.

Regarding chronic models of epilepsy, it is noteworthy that limbic kindling features are distinguished from models of TLE induced by kainic acid or pilocarpine, which are initiated by severe SE associated to prominent temporal and extratemporal damage, in addition to the rapid emergence of spontaneous recurrent seizures.⁷⁰ Instead, kindling produces subtle but cumulative neuronal loss and a number of cellular alterations in brain circuits that eventually result in spontaneous seizures.⁶⁸ Therefore, despite being laborious, kindling provides an opportunity to study the dynamics of epileptogenic processes that are particularly relevant to TLE.⁷⁰ Recently, Srivastava et al⁷³ took advantage of both kindling and pharmacology approaches to develop a novel experimental model of pharmacoresistant epilepsy. The authors have demonstrated that even a single exposure to lamotrigine or carbamazepine 48 hours after kindling induction leads to a decrease in the ability of these AEDs to attenuate further evoked ADs.⁷³ Modeling pharmacoresistant epilepsies is, indeed, critical to developing new AEDs.²⁶ Another interesting approach is the combination of genetic engineering and electrophysiological models of seizures. For instance, two recent studies with transgenic mice have provided direct evidence that the development of kindling requires the BDNF receptor tyrosine kinase B (TrkB) activation through a specific phospholipase signaling.^{71,74} Although the tyrosine kinase B presence requirement for epileptogenesis has been evaluated mostly in kindling models, we have recently shown in human mesial TLE that increased hippocampal tyrosine kinase B expression also has a prominent role in secondary generalized seizures in addition to increased seizure frequency and poor surgical outcome.⁷⁵ Taken together, these findings point out the importance of combining the kindling approach with cutting-edge tools to delimit novel targets for the prevention of epileptogenesis and the treatment of pharmacoresistant epilepsies.

Brain pathology

The developing human brain is at higher risk of developing seizures, particularly during the first month of life.⁷⁶ In addition to possible insults associated with the birthing

process, the immature brain has a predominance of excitation over inhibition, which, on the one hand, is important for synaptogenesis but, on the other hand, increases seizure susceptibility.⁷⁷ Animal models of seizures in the developing brain provide a unique opportunity to study this enhanced excitability during development. The main question is whether seizures in this critical period disturb neuronal circuit development and whether such disturbances promote epileptogenesis and cognitive deficits later in life. We briefly describe two of the models most used to investigate these issues.

Hyperthermic seizures

Febrile seizures are frequent in early life, with a prevalence of 2%–5% in children younger than 5 years.⁷⁸ Although the majority of febrile seizures do not lead to sequelae, the outcome of complex febrile seizures (defined as seizures longer than 15 minutes with focal onset and possible recurrence within 24 hours) is controversial.⁷⁹ Although a small proportion of febrile seizure patients will develop epilepsy, retrospective studies of patients with refractory TLE indicate a history of febrile seizures in 20%–60% of cases.⁸⁰ Interestingly, recent studies have shown that patients with a history of febrile seizure display a different and genetic profile when compared with those without such a history.^{2,81} Animal models of febrile seizure were developed to investigate whether febrile seizures per se induce neuronal damage leading to epileptogenesis, and which mechanisms generate febrile seizures.³² Usually, P10–P12 rodent pups have their core temperature increased to 40°C–42°C by hot air stream for 30 minutes, stimulating prolonged convulsions. These seizures are subtler than those evoked by chemoconvulsants but are nevertheless identifiable by sudden immobility, usually followed by facial automatism and tonic body flexion.³² Ictal electroencephalography (EEG) activity consists of spike-waves and trains of spikes with increased amplitude in the hippocampus, amygdala, and temporal cortex.^{82,83} Respiratory alkalosis also seems to be a component of hyperthermic seizures, as they can be mimicked by systemic bicarbonate. Hyperthermic seizures are also abolished when alkalosis is suppressed.⁸²

One of the main questions is whether prolonged febrile seizures trigger mesial temporal lobe sclerosis and epileptogenesis. Indeed, rodent pups submitted to febrile seizures present with spontaneous seizure in adulthood.⁸⁴ In addition, they show enhanced susceptibility to kainic acid⁸³ and enhanced long-term potentiation induction in adulthood.⁸⁵

In particular, this proexcitatory condition does not involve evident neuronal loss,⁸⁶ which is different from what is seen in human TLE. Another difference is that in the febrile seizure model, seizures are induced by hyperthermia and not by fever, as in the human condition, which may implicate alternative mechanisms.

Neonatal hypoxia

Hypoxic encephalopathy is the most common cause of neonatal seizure.⁸⁷ These seizures can be prolonged and refractory to conventional AEDs, and common sequelae include neuromotor and neurocognitive deficits and epilepsy development.⁸⁸ The hypoxia rodent model was described by Jensen et al,⁸⁹ who managed to replicate the unique age-dependent neonatal susceptibility to hypoxia, refractoriness to conventional AEDs, and long-term increases of seizure susceptibility.³² In this model of global hypoxia, rat pups (P10–P12) are exposed to graded global hypoxia (7%–4% O₂) for 15 minutes in a gas chamber. Younger (P5) and adult (P60) animals do not undergo seizure in these conditions.⁹⁰

Rodents submitted to this hypoxia model develop spontaneous seizures later in life, as well as mossy fiber sprouting and long-term behavioral alterations, including social deficits, memory impairments, and aggressiveness.^{91,92} Despite the lack of early neuronal injury,⁹³ hypoxia-induced seizures promote hyperexcitability immediately after seizure recovery, facilitating long-term potentiation induction and generating longer ADs.⁹⁴ Increased excitability persists in the adult hippocampus, suggesting that the epileptogenic effects of hypoxia are mediated by permanent effects on excitability and plasticity within hippocampal networks.⁹⁴

Posttraumatic epilepsy

Traumatic brain injury (TBI) is one of the leading etiologies for symptomatic epilepsies in adults. Indeed, posttraumatic epilepsy (PTE) corresponds to 20% of all symptomatic epilepsies and refers to the condition in which recurrent spontaneous seizures occur more than 1 week after TBI.⁹⁵ A clinical history similar to what occurs in post-SE TLE takes place in post-TBI PTE (an initial precipitant injury, a latent period, and chronic manifestation of spontaneous seizures), although the exact mechanisms are still under investigation. In addition, PTE models usually present with long latent periods and low yield of epileptic animals. Given the high heterogeneity of TBI in humans, TBI animal models are also diverse (there are focal models of TBI, diffuse brain injury models, mixed models of focal and

diffuse brain injury, combined injury models, experimental models of coma, and models of repetitive concussive injury), although none of them recapitulates completely the human syndrome.⁹⁶

One of the most used strategies to simulate PTE is the fluid percussion injury model (FPI). In this model, a single episode of severe FPI is sufficient to cause PTE,^{97,98} and it may progress from frontal-parietal epilepsy to mesial TLE with dual pathology, as frequently found in human PTE.⁹⁹ Neuropathological correlates of mesial TLE such as mossy fiber sprouting and hippocampal neuron loss are also present in the FPI model of PTE.⁹⁸ Recently, Shultz et al¹⁰⁰ examined predictive imaging and behavioral biomarkers for PTE in the FPI model, and the most representative imaging correlate in the animals that developed PTE was found in the ipsilateral hippocampus at 1 week postinjury. However, it is unknown whether these findings are related to epileptogenic processes. Modeling PTE is laborious, and few studies have compared endophenotypes between patients and animals with PTE or have focused on testing the effects of candidate AED treatments.⁹⁶ If there is a true resemblance between post-SE TLE and post-TBI TLE, such as similarities in natural history of symptomatic epilepsy, neuropathological/neurochemical findings,⁹⁸ and presence of major depression as a shared risk factor,^{101,102} corroboration depends on further comparisons between these models. Such corroboration may result in improved treatments of PTE.

Genetics

Audiogenic seizures

Audiogenic seizures (AS) are generalized seizures provoked by high-intensity acoustic stimulation. Activation of auditory pathways is crucial for AS development, and the inferior colliculus in the auditory midbrain plays a key role in audiogenic seizure initiation, although other structures participate in AS progression.^{103,104}

The first audiogenic seizures were observed in the early 1920s in Pavlov's laboratory.¹⁰⁵ Since then, several audiogenic strains were created; for instance, Krushinsky-Molodkina in Russia,¹⁰⁶ Genetically Epilepsy-Prone Rat in the United States,¹⁰⁷ P77PMC rats in China,¹⁰⁸ Wistar Albino Glaxo/Rijwijk rats (WAG/Rij) in the Netherlands,¹⁰⁹ Wistar Audiogenic Sensitive Rat in France,¹¹⁰ and Wistar Audiogenic Rat (WAR) in Brazil.¹¹¹ In audiogenic susceptible animals, a single acoustic stimulus triggers a reflex seizure mimicking those seen in humans. It usually begins with wild running, which progresses to a tonic-clonic phase.

Postictal events are also frequent. Despite similarities among strains,¹⁰⁵ behavioral features of audiogenic seizures are strain-specific.

Moreover, acoustic stimulation can be applied to those strains in a chronic intermittent protocol called audiogenic kindling.¹¹² The audiogenic kindling protocol modifies the behavior and the EEG expression of audiogenic-induced seizures, recruiting limbic circuitries in audiogenic strains.¹¹³ In WARs, audiogenic kindling induces hippocampal neurogenesis,¹¹⁴ although mossy fiber sprouting and neurodegeneration were not found after more than 30 audiogenic seizures.^{114,115}

Audiogenic models of epilepsy have been used not only for reflex epilepsy and TLE studies but also to characterize comorbidities associated with the epilepsies. For example, although the WAG/Rij strain can be used as an audiogenic seizure model, it is better known as a genetic model of absence seizures.¹¹⁶ Therefore, the WAG/Rij is useful to study convulsive and nonconvulsive seizures in the same animal. It has also been proposed that the WAG/Rij strain is reliable for studying the comorbidity between absence epilepsy and depression, as depressive-like symptoms are present in this strain.¹¹⁷ In fact, major depression is a common comorbidity in focal human epilepsies.¹¹⁸ Studies with WARs are increasingly reinforcing that these rats can also be used to study mood disorders of epilepsy, such as pilocarpine-treated rats.¹¹⁹ Behavioral experiments indicate that naive WARs show anxiety-like behaviors.¹²⁰ Furthermore, WARs have morphological and functional alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis¹²¹ that seem to be related to changes in the autonomic control of the WAR's cardiovascular system.¹²² Because of the endogenous stress, hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, higher blood pressure, and increased sympathetic tonus, WARs might also be useful to investigate events related to sudden unexplained/unexpected death in epilepsy.

Limitations of the audiogenic seizure strains are the necessity of a trigger to evoke audiogenic seizures and the lack of spontaneous recurrent seizures. In contrast, advantages are the specific trigger (sound stimulation) and substantial characterization of behavioral, cellular, and molecular alterations in both acute and chronic (kindling) protocols. In fact, acute audiogenic seizures are good models of tonic-clonic seizures with brainstem origin. The combination of seizure predisposition, which is typical of genetically developed strains, and the possibility of chemically or electrically modulating seizures potentiates the usefulness of these models in elucidating epileptogenesis and its mechanisms.

Absence seizure models

Generalized epilepsies (~20% of all epilepsy cases)¹²³ are idiopathic, in that seizures spontaneously arise without evident causes. Unlike those seen in the focal epilepsies, idiopathic seizures have no discrete sites of initiation, as paroxysms suddenly and bilaterally spread to multiple EEG channels before rapidly vanishing from them.¹²⁴ Indeed, the etiology of idiopathic seizures is rather functional, given that pathological correlates are not as evident as in focal syndromes.

Absence seizures, especially those occurring in children and juveniles, are the prototypical form of idiopathic seizures.¹²⁵ They are characterized by usually brief (5–10 seconds), nonconvulsive episodes of behavioral arrest and apparent unconsciousness, although minimal levels of awareness might be retained.¹²⁶ Absence seizures produce spike-and-wave discharges (SWD; ~3 Hz) manifested on the normal EEG background as long as the behavioral activity remains halted.^{125,127} Similarities of SWD and sleep spindles, in addition to the transformation from spindles to SWD in cats injected with systemic penicillin (a GABA_A antagonist), suggest a link between absence seizures and superficial stages of sleep.¹²⁸ However, such a relationship is now uncertain, as absence seizures are also frequent during wakefulness, previous hypotheses of shared GABA_A-dependent mechanisms are no longer supported, and SWD generation depends on thalamo-cortico-thalamic networks, whereas spindles are of thalamic origin.^{128,129}

Given that SWD mechanisms remain elusive, animal models are still crucial for investigating absence seizures. Indeed, invasive recordings or excised tissues are hardly accessible from patients, as they cannot be surgically treated. The fact that acute insults are not major precipitators of absence seizures, together with their strong hereditary component, makes genetic models the most relevant tools for experimental research. Mouse models include the lethargic, tottering, leaner, and stargazer phenotypes,¹³⁰ whereas the main rat models are called Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS) and WAG/Rij.¹³¹ Mouse models of absence epilepsy have monogenic mutations affecting voltage-gated Ca²⁺ channels. In the soma of thalamic relays, T-type Ca²⁺ currents normally generate the burst firing that entrains thalamocortical networks into slow oscillations, primarily during non-rapid-eye-movement sleep.¹³² In mutant mice, those burst generators are more likely to engage neocortical pyramidal, dorsal thalamic, and GABAergic reticular thalamic neurons into aberrant SWD-like synchronization events.¹³⁰ Moreover,

net inhibition of thalamic relays, a situation that normally activates T-type Ca²⁺ currents, seems to be increased in tottering and lethargic mice. In this case, presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels on inputs to thalamocortical cells might be involved instead.¹³⁰

Mutation of P/Q-type Ca²⁺ channels brings a disadvantage to mouse models: alterations in neurotransmitter release induce collateral defects such as cerebellar ataxia. Another drawback of mouse models is that they offer monogenic mutations, whereas the inheritance of absence epilepsy among humans is believed to combine multiple genetic anomalies.¹²⁷ That is why the presumptively polygenic rat models GAERS and WAG/Rij are known to better simulate the human idiopathic epilepsies.^{133,134} Similar to mouse models, both GAERS and WAG/Rij show higher expression and function of T-type Ca²⁺ channels, reinforcing the idea that exaggerated burst firing in the dorsal thalamus contribute to absence seizures.¹²⁷ However, GAERS and WAG/Rij mutations are much more diverse, being age-dependent and/or region-specific. Those include a subtle reduction of D1 and D2 receptor densities in accumbal and striatal subregions, reduction of glutamate transporters on neocortical glia and neurons, increased expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid subunits in the neocortex, and increased tonic γ -aminobutyric acid-ergic transmission on thalamocortical cells.^{127,129} The complex profile of disturbances is also accompanied by subtle morphometric changes, the documentation of which is now increasing. A diffusion tensor imaging study showed that either myelination or fiber density in the corpus callosum are decreased to the extent that absence seizures recur in GAERS and WAG/Rij.¹³⁵ This suggests that structural modifications do result from absence seizures, indicating that advanced brain imaging will provide new ways to clinically monitor the idiopathic epilepsies.

The high complexity of GAERS and WAG/Rij models could represent a disadvantage; that is, difficult interpretation of a diverse (and not fully known) genetic scenario. Nevertheless, both strains respond to drugs used to treat epileptic patients,¹³⁴ supporting their face validity. Furthermore, SWD generalization in rats is similar to what was observed from the cat penicillin model,¹³⁶ in addition to being consistent with a human study that found phase locking between deep thalamic paroxysms and SWD from the scalp EEG.¹³⁷ By considering the contribution of genetic models, specialized authors conclude that cortex and thalamus are equally important in SWD generation,¹³³ although limbic structures contribute to that as well.¹²⁵

Table 1 Summary of main models reviewed

Model	Induction	Manifestations	Human relevance	Use	Limitations
Chemoconvulsants					
KA-SE	Systemic or intrahippocampal injection	Limbic SE and chronic seizures	TLE with hippocampal sclerosis	AED screening, mechanisms of epileptogenesis	High mortality; variable frequency and severity of spontaneous seizures; not all neural damage comes from seizures
Pilo-SE	Systemic or intrahippocampal injection	Limbic SE and chronic seizures	TLE with hippocampal sclerosis	AED screening, mechanisms of epileptogenesis, and cognitive/psychiatric comorbidities	High mortality; variable frequency and severity of spontaneous seizures; neocortical lesions
Acute chemical models	Systemic or intrahippocampal injection	Nonconvulsive absence or generalized tonic-clonic seizures, depending on the drug and dose	Acute and repetitive seizures	Rapid screening of AED, effect of repetitive seizures	Lack of spontaneous recurrent seizures and of neuronal loss or other neuropathological hallmarks
SE in immature rodents	Systemic injection of KA or Pilo	Tonic-clonic seizures	Prolonged seizures during development	Epileptogenesis and long-term consequences	KA and Pilo are not clinical causes of seizures; more extensive damage compared with other models
Repetitive seizures in immature rodents	Systemic injection of PTZ or flurothyl inhalation	Myoclonic and generalized tonic-clonic seizures	Repetitive brief seizures during development	AED screening and cognitive deficits	No spontaneous seizures in adulthood
Electrical stimulation					
Electroshock-induced seizures	Corneal or auricular stimulation	Generalized tonic-clonic seizures	Tonic-clonic seizures	AED screening and molecular and physiological alterations related to epileptiform activities	Low predictive validity for some AEDs
Afterdischarges	Focal electrical stimulation	Complex partial seizures and myoclonic seizures	Focally generated seizure-like patterns that often spread to other regions	Electrophysiological and behavioral changes caused by focally generated seizure patterns	No specificity for groups of neurons; studying neuronal activity during stimulation is difficult
Kindling	Repeated afterdischarge induction	Partial seizures evolving into secondary generalization and, eventually, spontaneous seizures	Consequences of poorly controlled seizures and dynamics of epileptogenic processes	Prevention of epileptogenesis processes and treatment of pharmacoresistant epilepsies	Costly and time-consuming procedure
Brain pathology					
Hyperthermic seizures	Increase of body temperature in immature rodents through stream of heated air	Immobility, facial automatism, myoclonic jerks	Febrile seizure	Epileptogenesis mechanisms and cognitive consequences	Subtle behavioral seizures, necessity of EEG recording, possible morbidity from heat exposure
Hypoxia model	Exposure to air with low O ₂ concentration in immature rodents	Brief and repetitive tonic-clonic seizures	Neonatal hypoxic encephalopathy	AED screening, long-term consequences, and epileptogenesis mechanisms	Susceptibility for seizures varies with the strain and age of rodents

(Continued)

Posttraumatic epilepsy	Rostral parasagittal fluid percussion injury	Generalized tonic-clonic seizures in the long term, with low frequency	Posttraumatic epilepsy	AED screening, mechanisms of epileptogenesis, and hippocampal sclerosis with dual pathology	Laborious induction, long latency periods, mild seizures during the first 4 months posttrauma
Genetic models					
Audiogenic models	Acoustic stimulation in genetically prone rats	Wild running and tonic-clonic seizures	Reflex epilepsy and TLE studies	Epileptogenesis mechanisms and comorbidities associated with epilepsies	Necessity of a trigger to evoke seizures; lack of spontaneous recurrent seizures
GAERS, WAG/Rij, and mouse models of absence seizures	Spontaneous seizures	SWD generalization, behavioral arrest	Generalized idiopathic epilepsies	Electrographic and behavioral similarity to human absence seizures, response to AEDs	Diverse (and not fully known) genetic alterations
Abbreviations: KA, kainic acid; SE, status epilepticus; TLE, temporal lobe epilepsy; AED, antiepileptic drugs; Pilo, pilocarpine; PTZ, pentylenetetrazol; EEG, electroencephalography; GAERS, Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg; WAG/Rij, Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats; SWD, spike-and-wave discharges.					

Conclusion

Animal models of epilepsy include several tools, including neurochemical agents, electrical stimulation protocols, thermal or hypoxic insults, traumatic injuries, optogenetics, and rodent strains with idiopathic or audiogenic-induced seizures. Important features, uses, and limitations of the models reviewed here are summarized in Table 1.

Chemoconvulsants allow for rapid investigation of epileptogenic mechanisms and AED screening at the expense of high mortality of subjects and high variability in the frequency and severity of spontaneous seizures. Electrical stimulation protocols are less harmful to subjects and offer better control of seizures, but electrophysiological procedures can be costly and time-consuming. Nonchemical and nonelectrical insults might approximate clinical conditions of developmental epilepsies, but inconsistencies in seizure susceptibility depending on experimental procedures hamper comparisons between rodents and humans. Finally, seizure-prone strains eliminate much of the artificiality of experimentally induced seizures, but their genetic alterations are not fully known, not to mention that sensorial triggers are still needed to induce seizures in strains such as WARs. Such a number of experimental options probably reflect the diversity of seizure types in humans. Even focal syndromes yield brain-wide alterations, thereby precipitating cognitive and psychiatric disturbances. The quest for seizure mechanisms can additionally provide insights into overall brain functions and consciousness, and animal models will continue to promote the progress of both epilepsy and neurophysiology research.

Acknowledgments

This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (CInAPCe project 05/56447-7, to JPL), the National Council for Scientific and Technological Development, and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (project A034_2013, to LK) in Brazil.

Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav.* 2009;14(suppl 1):32–37.
- Kandratavicius L, Rosa-Neto P, Monteiro MR, et al. Distinct increased metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) in temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. *Hippocampus.* 2013; 23(12):1212–1230.
- Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* 2002;50(1–2):93–103.

4. Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res.* 2002;135:237–251.
5. Lothman EW, Bertram EH III. Epileptogenic effects of status epilepticus. *Epilepsia.* 1993;34(s1)(suppl 1):S59–S70.
6. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol.* 2007;35(7):984–999.
7. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 1978;271(5646):676–677.
8. Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, et al. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol Scand.* 2009;119(5):293–303.
9. Bonilha L, Elm JJ, Edwards JC, et al. How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia.* 2010;51(9):1774–1779.
10. Furtado MA, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 2002;43(suppl 5):37–39.
11. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9(3):315–335.
12. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 1991;32(6):778–782.
13. Leite JP, Cavalheiro EA. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Res.* 1995;20(2):93–104.
14. Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, Dehnicke C, Heinemann U, Behr J. Comment on “On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro”. *Science.* 2003;301(5632):463.
15. Knopp A, Kivi A, Wozny C, Heinemann U, Behr J. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol.* 2005;483(4):476–488.
16. Kandratavicius L, Monteiro MR, Assirati JA Jr, Carlotti CG Jr, Hallak JE, Leite JP. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(11):1029–1042.
17. Mudò G, Jiang XH, Timmusk T, Bindoni M, Belluardo N. Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. *Epilepsia.* 1996;37(2):198–207.
18. Kandratavicius L, Monteiro MR, Hallak JE, Carlotti CG Jr, Assirati JA Jr, Leite JP. Microtubule-associated proteins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with granular cell layer dispersion. *Biomed Res Int.* 2013;2013:960126.
19. Pauli E, Hildebrandt M, Romstöck J, Stefan H, Blümcke I. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology.* 2006;67(8):1383–1389.
20. Leite JP, Nakamura EM, Lemos T, Masur J, Cavalheiro EA. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res.* 1990;23(8):681–683.
21. Faure JB, Marques-Carneiro JE, Akimana G, et al. Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(5):644–653.
22. Barkmeier DT, Loeb JA. An animal model to study the clinical significance of interictal spiking. *Clin EEG Neurosci.* 2009;40(4):234–238.
23. Ni H, Li C, Tao LY, Cen JN. Physical exercise improves learning by modulating hippocampal mossy fiber sprouting and related gene expression in a developmental rat model of penicillin-induced recurrent epilepticus. *Toxicol Lett.* 2009;191(1):26–32.
24. Garcia-Cairasco N, Moyses-Neto M, Del Vecchio F, et al. Elucidating the neurotoxicity of the star fruit. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52(49):13067–13070.
25. Löscher W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol.* 1997;53(2):239–258.
26. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20(5):359–368.
27. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002;50(1–2):105–123.
28. Shinnar S, Pellock JM, Moshé SL, et al. In whom does status epilepticus occur: age-related differences in children. *Epilepsia.* 1997;38(8):907–914.
29. Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, Scott RC. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2006;5(9):769–779.
30. Kubová H, Mareš P, Suchomelová L, Brozek G, Druga R, Pitkänen A. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci.* 2004;19(12):3255–3265.
31. Hirsch E, Baram TZ, Snead OC III. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 1992;583(1–2):120–126.
32. Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL. *Models of seizures and epilepsy.* Amsterdam: Elsevier Academic; 2006.
33. Leite JP, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Yeoman KM, Mathern GW. Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. *Epilepsy Res.* 1996;26(1):219–231.
34. Cross DJ, Cavazos JE. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model. *Epilepsy Res.* 2007;73(2):156–165.
35. Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, Huang LT, Holmes GL. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. *Epilepsia.* 2003;44(4):518–528.
36. Kubová H, Druga R, Lukasiuk K, et al. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci.* 2001;21(10):3593–3599.
37. Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 1998;18(20):8382–8393.
38. Kubová H, Mareš P. Are morphologic and functional consequences of status epilepticus in infant rats progressive? *Neuroscience.* 2013;235:232–249.
39. Huang L, Cilio MR, Silveira DC, et al. Long-term effects of neonatal seizures: a behavioral, electrophysiological, and histological study. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999;118(1–2):99–107.
40. Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol.* 1999;404(4):537–553.
41. Weller A, Mostofsky DI. Ontogenetic development and pentylenetetrazol seizure thresholds in rats. *Physiol Behav.* 1995;57(4):629–631.
42. Holmes GL, Gairsa JL, Chevassus-Au-Louis N, Ben-Ari Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol.* 1998;44(6):845–857.
43. Liu Z, Yang Y, Silveira DC, et al. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience.* 1999;92(4):1443–1454.
44. Riviello P, de Rogalski Landrot I, Holmes GL. Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002;135(1–2):101–104.
45. Herman AE, Holmes GL, Isaev D, Scott RC, Isaeva E. Altered short-term plasticity in the prefrontal cortex after early life seizures. *Neurobiol Dis.* 2013;50:120–126.

46. Kleen JK, Sesqué A, Wu EX, et al. Early-life seizures produce lasting alterations in the structure and function of the prefrontal cortex. *Epilepsy Behav.* 2011;22(2):214–219.
47. Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.* 1988;2(3):145–181.
48. Frankel WN, Taylor L, Beyer B, Tempel BL, White HS. Electroconvulsive thresholds of inbred mouse strains. *Genomics.* 2001;74(3):306–312.
49. Browning RA, Nelson DK. Variation in threshold and pattern of electroshock-induced seizures in rats depending on site of stimulation. *Life Sci.* 1985;37(23):2205–2211.
50. Epps SA, Weinshenker D. Rhythm and blues: animal models of epilepsy and depression comorbidity. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(2):135–146.
51. Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci.* 2004;24(24):5603–5610.
52. Calais JB, Valvassori SS, Resende WR, et al. Long-term decrease in immediate early gene expression after electroconvulsive seizures. *J Neural Transm.* 2013;120(2):259–266.
53. Sloan DM, Zhang D, Bertram EH III. Increased GABAergic inhibition in the midline thalamus affects signaling and seizure spread in the hippocampus-prefrontal cortex pathway. *Epilepsia.* 2011;52(3):523–530.
54. Velisek L, Mareš P. Hippocampal afterdischarges in rats. I. Effects of antiepileptics. *Physiol Res.* 2004;53(4):453–461.
55. Ma J, Leung LS. Kindled seizure in the prefrontal cortex activated behavioral hyperactivity and increase in accumbens gamma oscillations through the hippocampus. *Behav Brain Res.* 2010;206(1):68–77.
56. Kotloski R, Lynch M, Lauersdorf S, Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog Brain Res.* 2002;135:95–110.
57. Norwood BA, Bumanglag AV, Osculati F, et al. Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single “cryptic” episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J Comp Neurol.* 2010;518(16):3381–3407.
58. Bragin A, Penttonen M, Buzsáki G. Termination of epileptic afterdischarge in the hippocampus. *J Neurosci.* 1997;17(7):2567–2579.
59. Ma J, Leung LW. Medial septum mediates the increase in post-ictal behaviors and hippocampal gamma waves after an electrically induced seizure. *Brain Res.* 1999;833(1):51–57.
60. Leung LS, Ma J, McLachlan RS. Behaviors induced or disrupted by complex partial seizures. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24(7):763–775.
61. Ma J, Brudzynski SM, Leung LW. Involvement of the nucleus accumbens-ventral pallidal pathway in postictal behavior induced by a hippocampal afterdischarge in rats. *Brain Res.* 1996;739(1–2):26–35.
62. Ma J, Brudzynski SM, Leung LW. A role of subicular and hippocampal afterdischarges in initiation of locomotor activity in rats. *Brain Res.* 1998;793(1–2):112–118.
63. Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, et al. Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e60928.
64. Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods.* 2011;8(1):26–29.
65. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol.* 1969;25(3):295–330.
66. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32(3):269–279.
67. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32(3):281–294.
68. Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci.* 2003;23(7):2759–2768.
69. Sloviter RS, Zappone CA, Bumanglag AV, Norwood BA, Kudrimoti H. On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2007;48(s8)(suppl 8):6–10.
70. Sutula TP. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res.* 2004;60(2–3):161–171.
71. He XP, Wen R, McNamara JO. Impairment of kindling development in phospholipase C γ 1 heterozygous mice. *Epilepsia.* 2014;55(3):456–463.
72. Avanzini G, Depaulis A, Tassinari A, de Curtis M. Do seizures and epileptic activity worsen epilepsy and deteriorate cognitive function? *Epilepsia.* 2013;54(suppl 8):14–21.
73. Srivastava AK, Alex AB, Wilcox KS, White HS. Rapid loss of efficacy to the antiseizure drugs lamotrigine and carbamazepine: a novel experimental model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(7):1186–1194.
74. Kotloski R, McNamara JO. Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus.* 2010;20(6):713–723.
75. Kandratavicius L, Hallak J, Carlotti C, Assirati J, Leite J. Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):81.
76. Holmes GL. The long-term effects of neonatal seizures. *Clin Perinatol.* 2009;36(4):901–914, vii–viii.
77. Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 2009;5(7):380–391.
78. Baumann RJ, Duffner PK; American Academy of Pediatrics. Treatment of children with simple febrile seizures: the AAP practice parameter. *Pediatr Neurol.* 2000;23(1):11–17.
79. Dubé CM, McClelland S, Choy MK, et al. Fever, febrile seizures and epileptogenesis. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al, eds. *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information; 2012.
80. French JA, Williamson PD, Thadani VM, et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol.* 1993;34(6):774–780.
81. Kasperaviciute D, Catarino CB, Matarin M, et al; UK Brain Expression Consortium. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain.* 2013;136(Pt 10):3140–3150.
82. Schuchmann S, Schmitz D, Rivera C, et al. Experimental febrile seizures are precipitated by a hyperthermia-induced respiratory alkalosis. *Nat Med.* 2006;12(7):817–823.
83. Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol.* 2000;47(3):336–344.
84. Dubé CM, Ravizza T, Hamamura M, et al. Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *J Neurosci.* 2010;30(22):7484–7494.
85. Notenboom RG, Ramakers GM, Kamal A, Spruijt BM, de Graan PN. Long-lasting modulation of synaptic plasticity in rat hippocampus after early-life complex febrile seizures. *Eur J Neurosci.* 2010;32(5):749–758.
86. Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, Ribak CE, Baram TZ. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. *J Neurosci.* 1998;18(11):4285–4294.
87. Aicardi J, Chevrie JJ. Convulsive status epilepticus in infants and children. A study of 239 cases. *Epilepsia.* 1970;11(2):187–197.
88. White HS. Animal models of epileptogenesis. *Neurology.* 2002;59(9)(suppl 5):S7–S14.
89. Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, Belin TR, Burchfiel JL. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol.* 1991;29(6):629–637.
90. Jensen FE, Blume H, Alvarado S, Firkusny I, Geary C. NBQX blocks acute and late epileptogenic effects of perinatal hypoxia. *Epilepsia.* 1995;36(10):966–972.

91. Rakhade SN, Klein PM, Huynh T, et al. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia*. 2011;52(4):753–765.
92. Talos DM, Sun H, Zhou X, et al. The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *PLoS ONE*. 2012; 7(5):e35885.
93. Sanchez RM, Jensen FE. Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia*. 2001; 42(5):577–585.
94. Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, Liu Z, Geary C, Stevens MC. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia In vivo. *J Neurophysiol*. 1998;79(1):73–81.
95. Pitkänen A, McIntosh TK. Animal models of post-traumatic epilepsy. *J Neurotrauma*. 2006;23(2):241–261.
96. Pitkänen A, Immonen RJ, Gröhn OH, Kharatishvili I. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*. 2009;50(suppl 2):21–29.
97. D'Ambrosio R, Fairbanks JP, Fender JS, Born DE, Doyle DL, Miller JW. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain*. 2004;127(Pt 2):304–314.
98. Kharatishvili I, Nissinen JP, McIntosh TK, Pitkänen A. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience*. 2006;140(2):685–697.
99. D'Ambrosio R, Fender JS, Fairbanks JP, et al. Progression from frontal-parietal to mesial-temporal epilepsy after fluid percussion injury in the rat. *Brain*. 2005;128(Pt 1):174–188.
100. Shultz SR, Cardamone L, Liu YR, et al. Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*. 2013;54(7):1240–1250.
101. Kharatishvili I, Pitkänen A. Posttraumatic epilepsy. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(2):183–188.
102. Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Cascino G. Major depression is a risk factor for seizures in older adults. *Ann Neurol*. 2000; 47(2):246–249.
103. Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res*. 2002;168(1–2):208–222.
104. Garcia-Cairasco N, Terra VC, Doretto MC. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behav Brain Res*. 1993;58(1–2):57–67.
105. Ross KC, Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24(6):639–653.
106. Krushinsky VL. News in investigations of experimental epilepsy. *Usp Sovrem Biol*. 1949;28:108–133.
107. Jobe PC, Picchioni AL, Chin L. Role of brain norepinephrine in audiogenic seizure in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973;184(1):1–10.
108. Zhao DY, Wu XR, Pei YQ, Zuo QH. Kindling phenomenon of hyperthermic seizures in the epilepsy-prone versus the epilepsy-resistant rat. *Brain Res*. 1985;358(1–2):390–393.
109. van Luijckelaar EL, Coenen AM. Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci Lett*. 1986;70(3):393–397.
110. Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp Neurol*. 1987;97(1):160–168.
111. Doretto MC, Fonseca CG, Lôbo RB, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet*. 2003;33(1):33–42.
112. Kiesmann M, Marescaux C, Vergnes M, Micheletti G, Depaulis A, Warter JM. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological, and electroencephalographic studies. *J Neural Transm*. 1988;72(3):235–244.
113. Dutra Moraes MF, Galvis-Alonso OY, Garcia-Cairasco N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res*. 2000;39(3):251–259.
114. Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience*. 2003; 119(2):533–546.
115. Galvis-Alonso OY, Cortes De Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience*. 2004;125(3):787–802.
116. Coenen AM, Van Luijckelaar EL. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res*. 1987;1(5):297–301.
117. Sarkisova K, van Luijckelaar G. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35(4):854–876.
118. Kandratavicius L, Ruggiero RN, Hallak JE, Garcia-Cairasco N, Leite JP. Pathophysiology of mood disorders in temporal lobe epilepsy. *Rev Bras Psiquiatr*. 2012;34(suppl 2):S233–S245.
119. Pineda E, Shin D, Sankar R, Mazarati AM. Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms. *Epilepsia*. 2010;51(suppl 3):110–114.
120. Garcia-Cairasco N, Oliveira JA, Wakamatsu H, Bueno ST, Guimarães FS. Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. *Physiol Behav*. 1998;64(5):671–674.
121. Umeoka EH, Garcia SB, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, Garcia-Cairasco N. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Res*. 2011;1381:141–147.
122. Fazan R Jr, de Oliveira M, Oliveira JA, Salgado HC, Garcia-Cairasco N. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. *Epilepsy Behav*. 2011;22(4): 666–670.
123. Jallon P, Latour P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*. 2005;46(s9)(suppl 9):10–14.
124. Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav*. 2009;15(4):404–412.
125. Onat FY, van Luijckelaar G, Nehlig A, Snead OC III. The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2013;103(2–3):111–123.
126. Bayne T. The presence of consciousness in absence seizures. *Behav Neurol*. 2011;24(1):47–53.
127. Jones NC, O'Brien TJ, Powell KL. Morphometric changes and molecular mechanisms in rat models of idiopathic generalized epilepsy with absence seizures. *Neurosci Lett*. 2011;497(3):185–193.
128. Leresche N, Lambert RC, Errington AC, Crunelli V. From sleep spindles of natural sleep to spike and wave discharges of typical absence seizures: is the hypothesis still valid? *Pflügers Arch*. 2012;463(1):201–212.
129. Crunelli V, Cope DW, Terry JR. Transition to absence seizures and the role of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res*. 2011;97(3): 283–289.
130. Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca²⁺ channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2):103–120.
131. Akman O, Demiralp T, Ates N, Onat FY. Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2010;89(2–3):185–193.
132. Llinás RR, Steriade M. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol*. 2006;95(6):3297–3308.
133. Avoli M. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia*. 2012;53(5):779–789.

134. van Luijckelaar EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002;24 Suppl D:65–70.
135. Chahboune H, Mishra AM, DeSalvo MN, et al. DTI abnormalities in anterior corpus callosum of rats with spike-wave epilepsy. *Neuroimage*. 2009;47(2):459–466.
136. Fisher RS, Prince DA. Spike-wave rhythms in cat cortex induced by parenteral penicillin. I. Electroencephalographic features. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1977;42(5):608–624.
137. Williams D. A study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain*. 1953;76(1):50–69.

Neuropsychiatric Disease and Treatment

Dovepress

Publish your work in this journal

Neuropsychiatric Disease and Treatment is an international, peer-reviewed journal of clinical therapeutics and pharmacology focusing on concise rapid reporting of clinical or pre-clinical studies on a range of neuropsychiatric and neurological disorders. This journal is indexed on PubMed Central, the 'PsycINFO' database and CAS,

and is the official journal of The International Neuropsychiatric Association (INA). The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/neuropsychiatric-disease-and-treatment-journal>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia

Ludmyla Kandratavicius^{1,2*}, Priscila Alves Balista¹, Daniele Cristina Wolf¹, Joao Abrao³, Paulo Roberto Evora⁴, Alfredo Jose Rodrigues⁴, Cristiano Chaves¹, Joao Paulo Maia-de-Oliveira⁵, Joao Pereira Leite^{1,2}, Serdar Murat Dursun⁶, Glen Bryan Baker⁶, Francisco Silveira Guimaraes⁷ and Jaime Eduardo Cecilio Hallak^{1,2,8}

Abstract

Background: Better treatments for schizophrenia are urgently needed. The therapeutic use of the nitric oxide (NO)-donor sodium nitroprusside (SNP) in patients with schizophrenia has shown promising results. The role of NO in schizophrenia is still unclear, and NO modulation is unexplored in ketamine (KET) animal models to date. In the present study, we compared the behavioral effects of pre- and post-treatment with SNP, glyceryl trinitrate (GTN), and methylene blue (MB) in the acute KET animal model of schizophrenia.

The present study was designed to test whether acute SNP, GTN, and MB treatment taken after (therapeutic effect) or before (preventive effect) a single KET injection would influence the behavior of rats in the sucrose preference test, object recognition task and open field.

Results: The results showed that KET induced cognitive deficits and hyperlocomotion. Long-term memory improvement was seen with the therapeutic GTN and SNP treatment, but not with the preventive one. MB pretreatment resulted in long-term memory recovery. GTN pre-, but not post-treatment, tended to increase vertical and horizontal activity in the KET model. Therapeutic and preventive SNP treatment consistently decreased KET-induced hyperlocomotion.

Conclusion: NO donors – especially SNP – are promising new pharmacological candidates in the treatment of schizophrenia. In addition, we showed that the potential impact of NO-related compounds on KET-induced behavioral changes may depend on the temporal window of drug administration.

Keywords: Sodium nitroprusside, Glyceryl trinitrate, Methylene blue, Ketamine model, Schizophrenia, Therapeutic treatment, Preventive treatment

Background

Schizophrenia treatment represents a major challenge. We have recently reported in a randomized, placebo-controlled trial, a safe, rapid, and long-lasting improvement of positive, negative, anxiety, and depressive symptoms in patients with schizophrenia after a single intravenous injection of the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) [1]. SNP was also effective in clozapine-refractory schizophrenia [2]. In the rat model of schizophrenia using phencyclidine (PCP) injection, pretreatment with SNP abolished behavioral changes

associated with positive symptoms, such as hyperactivity and stereotyped behavior [3]. Although no alterations in prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response after SNP treatment have been reported in naïve rats [4], a recent study showed that SNP increased PPI response in naïve mice, and SNP pretreatment blocked PPI disruption induced by amphetamine [5].

Despite contradictory results in PPI when analyzed in rats or in mice, SNP produced an unequivocal improvement in schizophrenic patients [1,2] and in animal models [3,5]. The exact antipsychotic mechanism of action of SNP is unclear, but it may act through the glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway, which is altered in schizophrenia [6]. In addition, there is evidence of interaction between SNP/NO and the dopaminergic system [7,8].

* Correspondence: ludykandra@gmail.com

¹Department of Neurosciences and Behavior, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Av Bandeirantes 3900, CEP 14049-900 Ribeirao Preto, Brazil

²Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), USP, Ribeirao Preto, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Glyceryl trinitrate (GTN) is another NO donor. Unlike SNP, which once in the blood stream dissociates immediately and releases NO [9], GTN is able to react with reduced thiols, cysteine derivatives, ascorbate and mitochondrial aldehyde dehydrogenase, yielding bioactive nitrites and NO [10]. On the other hand, methylene blue (MB), a phenothiazine compound routinely used to inhibit soluble guanylate cyclase (sGC) and isoforms of NO synthase (NOS), inactivates NO by generation of superoxide anions [11]. Interestingly, MB pretreatment shows antipsychotic-like properties in the MK-801 mouse model [12].

Sub-anesthetic doses of ketamine (KET), a non-competitive NMDA receptor antagonist, elicit positive and negative symptoms, and cognitive deficits in humans [13] and animal models [14,15]. Single or repeated KET administration induces changes in systems involving glutamate, dopamine, serotonin and gamma-aminobutyric acid (GABA), neurotransmitters implicated in schizophrenia pathophysiology [16]. Glutamate and dopamine altered neurotransmission are particularly involved in positive and negative symptoms, and in cognitive deficits observed in schizophrenia [17], which makes the acute KET model useful for explaining this impairments [15].

The role of NO in schizophrenia is complex and still unclear. Antipsychotic-like properties have been demonstrated in animal models using either pretreatment with NO donors [3,5] or with NO inhibitors [12,18]. NO modulation is unexplored in KET animal models to date, although hippocampal increase of NADPH-diaphorase stained neurons with no changes in neuronal NOS expression has been reported in the sub-chronic KET rat model [14]. In the present study, we compared the behavioral effects of pre- and post-treatment with SNP, GTN or MB in the acute KET animal model of schizophrenia.

Methods

Animals

The procedures followed guidelines from the Brazilian Council for Control of Animal Experimentation, and were approved by our local Commission for Ethics in Animal Experimentation (University of Sao Paulo School, Ribeirao Preto School of Medicine; protocol #102/2012). We used 2 month-old male Wistar rats weighing 250-280 g at the beginning of the experiments. Rats were housed in pairs within standard plastic cages before the beginning of the experiments for 1 week after arriving in our facility, and alone during the period when the sucrose preference test was performed, as detailed bellow. Animals had free access to food and water. The colony room was maintained at 21-24°C and on a 12 h:12 h light-dark cycle (lights on at 7 a.m.).

Drugs and experimental timeline

Twelve groups of rats ($n = 12$ to 14 per group, total of 150) were formed according to the injection scheme

showed in Figure 1. A maximum of 12 animals (~3 per group) were handled in each 72 hours of experiment in order to assure that all initial injections occurred between 8 and 9 a.m. and that subsequent behavioral tests happened within a very similar time window. Saline (0.9% w/v, Isofarma, Eusebio, Brazil) was administered intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.1 ml/100 g body weight. KET (30 mg/kg, Ketamin S(+), Cristalia, Itapira, Brazil) was administered i.p. in a volume of 1 ml/100 g body weight (dose based on Keilhoff *et al.* [14]). GTN (10 mg/kg, Tridil, Cristalia, Itapira, Brazil) was administered i.p. in a volume of 0.1 ml/100 g body weight (dose based on Pardutz *et al.* [19]). SNP (5 mg/kg, Nitropruss, Cristalia, Itapira, Brazil) was administered i.p. in a volume of 0.1 ml/100 g body weight (dose based on Bujas-Bobanovic *et al.* [3]), protected from light until injection. MB (4 mg/kg, Azul de Metileno P.A., Synth, Diadema, Brazil) was administered i.p. in a volume of 0.4 ml/100 g body weight (dose based on Riha *et al.* [20]). KET was freshly dissolved in saline before each experiment. GTN and SNP were freshly dissolved in 5% (w/v) glucose solution (Isufarma, Eusebio, Brazil) before each experiment. MB was freshly dissolved in milliQ water.

Initially, 4 groups were injected with saline at time 0 and treated with saline, GTN, SNP or MB 30 minutes later (Figure 1, yellow boxes). Four other groups were injected with KET at time 0, and post-treated with saline, GTN, SNP or MB 30 minutes later (Figure 1, green boxes). Four other groups were pretreated with saline, GTN, SNP or MB at time 0 and then injected with KET 30 minutes later (Figure 1, light red boxes). Behavioral tests started 15 minutes after the last injection, as shown in Figure 1. Intervals between injections were defined based on the assumption that we planned to treat the ketamine injected animals during the peak of their positive-like symptoms manifestation, which occurs around 30 minutes after ketamine injection. In consequence, groups on the therapeutic scheme (Figure 1, green boxes) were evaluated (in the open field, for instance) right after this peak, while the groups on the preventive scheme (Figure 1, light red boxes) were still under the acute effect of ketamine. Even though groups on the therapeutic and on the preventive scheme were not in the exactly same time window during open field evaluation, they were both equally under the most prominent effects of ketamine: cognitive deficits and correlates of positive symptoms (please see more details in Results).

Behavioral tests

Sucrose preference

Preference was examined by placing one animal per cage for 72 h with free access to food and with two identical graduated water bottles randomly allocated in the cage (changed after each 24 h), one containing 250 ml of tap water and the other 250 ml of 1% w/v sucrose (Synth, Diadema, Brazil) in

tap water. The final volume of each bottle was measured at the end of 24 hours, during 3 consecutive days. Total fluid intake during 72 h in all groups was not different from SAL + SAL (Kruskal-Wallis Dunn's $Q < 2.124$, $p > 0.06$) or among all groups (Kruskal-Wallis Dunn's $Q < 3.160$, $p > 0.05$). Thus, sucrose preference was calculated as the ratio of sucrose intake to total fluid intake and values converted to percentage. Anhedonia, an important component of depressive symptoms, can be assessed in rats by the loss of preference of sweetened water over regular water [21]. In schizophrenia, anhedonia is part of the negative and mood symptoms admixture [22].

Object recognition

The object recognition task was performed as described elsewhere [23]. In brief, 20 min habituation with no objects in the arena took place 65 min after the first injection. The next day, training (interaction with two identical objects during 5 minutes) and a test phase 30 min later (one of the objects was replaced by a new object with different shape) occurred 24 hours after the first injection. The following day, 48 hours after the first injection, a "late test phase" was performed, where the animal was allowed to explore one object known since the training phase and a different new one (different from the new object presented in the test phase). A rat was always placed into the center of the arena. Measurements of interaction with each of the objects were taken. Percentage of time spent in exploring the new as compared with the familiar object was used. After each session, the arena and objects were cleaned thoroughly with 20% ethanol to ensure that behavior of the rats was not guided by odor cues. The new object recognition task is sensitive to disruption by NMDA receptor antagonists with good predictive validity, and it is useful to access cognitive dysfunction in schizophrenia models [24].

Open field

Locomotor activity was monitored for 20 minutes within an open-field square arena (46 × 46 cm) with a white floor

bounded by transparent acrylic walls (Insight, Ribeirao Preto, Brazil). Infrared motion sensors recorded the locomotion and non-ambulatory activities (rearing: upward motion either with forepaws in contact with the wall or freestanding and measured as number of attempts), and the values were averaged in 4 min blocks or shown as total scores over 20 min. Velocity was also measured and yielded similar results (data not shown) as those for distance. Changes in locomotion patterns in the open field, like hyperactivity (increased vertical and horizontal activity) are commonly interpreted as psychotic-like behaviors [25]. Measures of anxiety-like behavior included the relative proportion of trajectory spent exploring the center quadrants relative to those located adjacent to the walls of the arena [26]. The open field arena was divided-by black lines-into 64 squares of 5.75 × 5.75 cm. The central 16 squares were defined as the central zone. Symptoms of anxiety are a central feature of schizophrenia since its characterization [22]. Rats were tested only once on the open field task, and were initially placed into the center of the arena.

Data analysis

Data were analyzed using the statistical program SigmaPlot (version 11) and SPSS (version 19). Groups were compared using analysis of variance (one-way ANOVA, with Bonferoni *post hoc* test) or Student T test for variables with normal distribution, and Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks (with Dunn *post hoc* test) or Mann-Whitney Rank Sum Test for variables without normal distribution. Statistical significance was set at $p < 0.05$, and values presented as mean ± standard error of mean.

Results

Sucrose preference test

Significant signs of anhedonia were not detected in control animals after GTN, SNP or MB injection, except for an increase in sucrose consumption in SAL + GTN compared to SAL + MB in the first 24 h ($Q = 3.275$, $p < 0.05$; Figure 2A). In the KET model, therapeutic treatment

with GTN ($Q = 2.731$, $p < 0.05$; Figure 2B) and MB ($Q = 2.674$, $p < 0.05$) resulted in anhedonia in the first 24 h when compared to KET + SAL. Pretreatment (Figure 2C) with GTN, SNP or MB did not result in anhedonia in the KET model.

Object recognition task

Control animals injected with SNP ($Q = 2.857$, $p < 0.05$) and MB ($Q = 2.873$, $p < 0.05$) showed impaired short term object recognition memory (Figure 3A). Compared to SAL + SAL, animals submitted to the KET model presented with significant impaired short term ($T < 5.259$, $p < 0.001$; hash signs in Figure 3B and C), and impaired long term object recognition memory ($T < 3.802$, $p < 0.001$; hash signs in Figure 3E and F). Recovery in long term memory was seen in KET animals post-treated with

GTN ($F = 3.380$, $p = 0.01$; Figure 3E) and with SNP (a trend, $p = 0.05$), but not on those pretreated. Long term memory improvement was seen in KET animals pretreated with MB ($F = 3.353$, $p = 0.03$; Figure 3F), but not on those post-treated.

Open field test

KET induced an acute anxiolytic effect, probably due to its antidepressant properties, since KET + SAL and SAL + KET animals spent increased proportion of their open field trajectory in the center when compared to SAL + SAL ($T < -2.180$, $p < 0.04$; hash signs in Figure 4B and C). No additional anxiolytic effect of GTN, SNP or MB was seen. Control animals injected with SNP showed decreased vertical activity when compared to SAL + SAL ($Q = 2.913$, $p < 0.05$; Figure 4D). Therapeutic treatment with SNP of KET-injected animals also resulted in decreased vertical activity ($Q = 3.026$, $p < 0.05$; Figure 4E). KET + MB showed increased vertical activity when compared to KET + SNP ($Q = 3.533$, $p < 0.05$). Preventive treatment had no effect, although GTN pretreatment resulted in an apparent increase in the total number of rearing, an indication of possible stimulant effect (Figure 4F).

Horizontal ambulation decreased in control animals treated with SNP only during the first 4 min of the open field test ($Q > 2.753$, $p < 0.05$; Figure 4G). KET-injected animals presented with hyperlocomotion during all time points of the open field test when compared to SAL + SAL ($T < -3.721$, $p < 0.003$; hash signs in Figure 4H and I). Therapeutic treatment with SNP in KET-injected animals reverted KET-induced hyperlocomotion ($F > 2.895$, $p < 0.04$; Figure 4H). Similarly, pretreatment with SNP prevented KET-induced hyperlocomotion ($F > 7.807$, $p < 0.03$; Figure 4I). Interestingly, while GTN therapeutic treatment of KET-injected animals tended to reduce locomotion, GTN preventive treatment increased hyperlocomotion, although not statistically significant when compared to SAL + KET.

Discussion

Besides reinforcing the role of NO donors – especially SNP – as promising new pharmacological candidates in the treatment of schizophrenia, the present results also assessed for the first time the potential impact of pre- versus post-treatment with these drugs in the KET model. Subtle differences were seen when comparing therapeutic and preventive SNP treatment, and different outcomes in GTN post-treatment and pretreatment. Therapeutic and preventive treatments lead to similar results in several animal models of neurologic disorders. Some examples include the use of MB, retinoic acid, and cyclophosphamide in animal models of Alzheimer's disease and Parkinson's disease, ischemia, and Guillain Barré syndrome [27–30]. By contrast, other drugs do

not exhibit the same effect when used as a therapeutic or preventive treatment. Other examples include the use of interleukin-12 in an animal model of airway inflammation [31] or Rolipram in an experimental autoimmune encephalomyelitis model [32]. Treatment with atypical antipsychotics during the prodromal phase has shown promising results in humans and in animal models of schizophrenia [33,34], but clearly the early intervention paradigm in psychotic disorders must be carefully examined during preclinical phases.

Our results showed significant short and long term memory deficits in the acute KET model consistent with findings in human schizophrenia and in animal models

[24]. Therapeutic treatment, but not preventive, with SNP and GTN was able to restore long term memory. MB pretreatment of KET-injected animals was effective in long term memory. Interestingly, SNP and MB induced short term memory deficits in control animals. Other studies on the role of NO donors on spatial working memory have shown no effects of S-Nitroso-N-acetylpenicillamine in control animals [35], or of molsidomine and SNP in a novel object recognition test [36], but the highest concentration of SNP used in this study was 5 times lower than in ours. Although it is likely that a lower SNP dose would not induce short term memory deficits in our control

animals, Bujas-Bobanovic et al. have already reported that SNP used only in doses higher than 4 mg/kg is able to abolish completely and in a prolonged fashion PCP-induced ataxia, hyperlocomotion and neuronal activation in several brain regions of the rat [3]. Low doses of SNP are not able to cause significant vascular effects in humans [1], but SNP can improve cerebral dynamics in experimental models [37,38]. Although NO donors may facilitate neurotoxic cascades [39], there is also reports on oxidative damage prevention [40]. Detailed neuropathological alterations in schizophrenia models following SNP remain to be investigated.

The preventive antipsychotic-like action of MB has been documented in a mouse model of schizophrenia using a single injection of MK-801 [12], but in our acute KET model MB was ineffective. MB has been successfully used in the treatment of depressive symptoms in bipolar patients [41]. These findings agree with reports that NO inhibitors may exhibit antidepressant effects in animal models [42]. MB has

also been used to reverse spatial memory deficits in rats [43], to improve memory in the amnesic mild cognitive impairment rat model [20], and in our KET model MB pretreatment resulted in long term memory recovery. A possible mechanism, as explored by Callaway et al. [43], would be through increased cytochrome c oxidase activity, enabling an increased metabolic capacity for oxidative energy metabolism in the brain that would improve memory retention. As a therapeutic treatment in the KET model, MB did not cause any memory improvement effect, suggesting that further increased energy metabolism might not be helpful when alterations caused by KET are already on course. In fact, frontal hypermetabolic pattern in positron emission tomography imaging using [18 F]deoxyglucose tracer has been demonstrated in unmedicated patients with schizophrenia [44] and in the KET animal model [45].

Although both GTN and SNP are NO donors, their therapeutic and preventive effects were dissimilar. Long-

term memory improvement was seen with therapeutic GTN treatment, but not with the preventive one. GTN pretreatment in the KET model increased vertical and horizontal activity, but that was not the case with GTN post-treatment. Therapeutic and preventive SNP treatment consistently decreased KET-induced hyperlocomotion. In healthy human subjects, GTN treatment does not change cognitive functions [46]. In the KET model, which exhibits cognitive deficits [24], NO-related compounds from the therapeutic treatment with SNP and GTN could improve memory deficit consolidation. Improvement of memory acquisition has also been seen in mice when NO production and neuronal NOS expression were induced, and this effect was abolished by a NO inhibitor [47,48]. In addition, neuronal NOS knock-out mice show impaired cognitive performance [49]. If SNP or GTN treatments result in alterations in NOS expression and how that could be related to memory performance remain open questions.

In a previous study, Bujas-Bubanic et al. [3] reported that SNP pretreatment of SAL-injected Sprague-Dawley rats resulted in a trend to decreased ambulation at the beginning of the open field test when compared to animals injected only with SAL. In our study using Wistar rats, decreased ambulation of SAL-injected animals treated with SNP when compared to animals treated with SAL was also only seen during the first 4 min of the open field test. Different sensitivity depending on strain could explain this tenuous difference. For instance, the effects of NO inhibition on reserpine-induced hypolocomotion seem to depend on the mouse strain used [50].

In the KET model, we noted an anxiolytic effect of KET when compared to control animals. Such effect was also reported when KET was used as a treatment in a model of posttraumatic stress disorder [51], and in anxious depressed patients [52]. Given that anxiety is part of schizophrenia symptoms [22], the acute KET model is not the most suitable model to evaluate its expression. Even with this limitation, we found that NO modulation was unable to affect anxiety-related parameters in control or in KET-injected animals. A similar rationale applies to the sucrose consumption test. While anhedonia may be a component of schizophrenia symptomatology [22], KET action as a fast antidepressant [53] would influence the hedonic state. However, our results suggest that therapeutic treatment with SNP in KET-injected animals has advantages for mood stability when compared to GTN and MB post-treatment. Interestingly, symptoms of anxiety and depression were also improved in patients with schizophrenia treated with SNP [1].

Nevertheless, NO inhibitors are frequently used as a preventive treatment in models of major depression [54,55]. If the effect of NO inhibitors is the same when used in a therapeutic scheme remains to be determined.

In the evaluation of cognitive parameters, preventive treatment with the NO donors molsidomine and S-Nitroso-N-acetylpenicillamine was successful in the MK-801 model [35,56]. Meanwhile, pretreatment with either a NO donor or a NO inhibitor was effective in the apomorphine model [36]. In a scenario of massive dopaminergic dysfunction, Gourgoutis et al. show that preventive use of NO donors and NO inhibitors might share similar beneficial outcomes on memory deficits due to their actions on two functionally opposing systems [36]. The exact neurochemical scenario of a glutamatergic dysfunction followed or anticipated by NO augmentation is still unknown, but our behavioral analyses favor therapeutic NO increases. Despite most studies with animal models of psychiatric conditions perform their evaluations using the preventive scheme and have thus contributed with valuable findings, in the clinical practice the therapeutic approach is more frequent. In the acute KET model, pre and post-treatment with GTN, SNP and MB were dissimilar in all behavioral instances analyzed, reassuring the importance of comparing treatment schemes in light of what is transposable to clinical trials.

Conclusion

In summary, our results using SNP in the acute KET model of schizophrenia reproduced and expanded the findings of the preventive effects described for the PCP model [3]. Also, SNP produced a marked and positive outcome when used as a therapeutic treatment, as also recently highlighted by clinical observations [1,2]. The effects of MB and GTN were more variable, suggesting that the involvement of NO-cGMP/sGC pathway-related molecules in schizophrenia is more complex than initially thought. Additional studies to better understand the differential mechanisms of preventive and therapeutic action of SNP and GTN in animal models may open new venues for treatment of schizophrenia.

Competing interests

The authors declare that they have no competing of interests.

Authors' contributions

Conception and design of research (LK, JEH); Performed research (PAB, DCW, CC, AJR); Analyzed data (LK, JEH, PAB, DCW, FSG); Contributed with reagents/analytic tools/important intellectual input (JA, PRE, JPMO, JPL); Wrote the paper (LK, JEH, FSG, GBB, SMD). All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundacao de Apoio a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (Fapesp, ClnAPCe Project 05/56447-7 to JPL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq), and Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, Project A034_2013 to LK). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Department of Neurosciences and Behavior, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Av Bandeirantes 3900, CEP 14049-900

Ribeirao Preto, Brazil. ²Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), USP, Ribeirao Preto, Brazil. ³Department of Biomechanics, Ribeirao Preto School of Medicine, Medicine and Rehabilitation, USP, Ribeirao Preto, Brazil. ⁴Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto School of Medicine, USP, Ribeirao Preto, Brazil. ⁵Brain Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. ⁶Department of Psychiatry (NRU), University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. ⁷Department of Pharmacology, Ribeirao Preto School of Medicine, USP, Ribeirao Preto, Brazil. ⁸National Institute of Science and Technology in Translational Medicine (INCT-TM – CNPq), Ribeirao Preto, Brazil.

Received: 18 November 2014 Accepted: 25 February 2015

Published online: 07 March 2015

References

- Hallak JE, Maia-de-Oliveira JP, Abrao J, Evora PR, Zuardi AW, Crippa JA, et al. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:668–76.
- Maia-de-Oliveira JP, Belmonte-de-Abreu P, Bressan RA, Cachoeira C, Baker GB, Dursun SM, et al. Sodium nitroprusside treatment of clozapine-refractory schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2014;34:761–3.
- Bujas-Bobanovic M, Bird DC, Robertson HA, Dursun SM. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1005–12.
- Wiley JL, Golden KM, Bowen SE. Effects of modulation of nitric oxide on acoustic startle responding and prepulse inhibition in rats. *Eur J Pharmacol*. 1997;328:125–30.
- Issy AC, Pedrazzi JF, Yoneyama BH, Del-Bel EA. Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231:663–72.
- Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophr Res*. 2005;78:69–86.
- Maia-de-Oliveira JP, Lobao-Soares B, Baker GB, Dursun SM, Hallak JE. Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor for novel treatment of schizophrenia, may also modulate dopaminergic systems. *Schizophr Res*. 2014;159:558–9.
- Lee BH, Kim YK. Reduced plasma nitric oxide metabolites before and after antipsychotic treatment in patients with schizophrenia compared to controls. *Schizophr Res*. 2008;104:36–43.
- Friederich JA, Butterworth JF. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. *Anesth Analg*. 1995;81:152–62.
- Mayer B, Beretta M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *Br J Pharmacol*. 2008;155:170–84.
- Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med Res Rev*. 2011;31:93–117.
- Deutsch SI, Rosse RB, Paul SM, Tomasino V, Koetznner L, Morn CB, et al. 7-Nitroindazole and methylene blue, inhibitors of neuronal nitric oxide synthase and NO-stimulated guanylate cyclase, block MK-801-elicited behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*. 1996;15:37–43.
- Hallak JE, Dursun SM, Bosi DC, de Macedo LR, Machado-de-Sousa JP, Abrao J, et al. The interplay of cannabinoid and NMDA glutamate receptor systems in humans: preliminary evidence of interactive effects of cannabidiol and ketamine in healthy human subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35:198–202.
- Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G, Bernstein HG. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience*. 2004;126:591–8.
- Frohlich J, Van Horn JD. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2014;28:287–302.
- Lindfors N, Barati S, O'Connor WT. Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Res*. 1997;759:205–12.
- Marcotte ER, Pearson DM, Srivastava LK. Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci*. 2001;26:395–410.
- Issy AC, Del Bel EA. 7-Nitroindazole blocks the prepulse inhibition disruption and c-Fos increase induced by methylphenidate. *Behav Brain Res*. 2014;262:74–83.
- Pardutz A, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport*. 2000;11:3071–5.
- Riha PD, Rojas JC, Gonzalez-Lima F. Beneficial network effects of methylene blue in an amnesic model. *Neuroimage*. 2011;54:2623–34.
- Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, Sankar R. Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav*. 2007;10:377–83.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res*. 2009;110:1–23.
- Wiescholleck V, Manahan-Vaughan D. PDE4 inhibition enhances hippocampal synaptic plasticity in vivo and rescues MK801-induced impairment of long-term potentiation and object recognition memory in an animal model of psychosis. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e89.
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther*. 2010;128:419–32.
- Schiörring E. An open field study of stereotyped locomotor activity in amphetamine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1979;66:281–7.
- Bath KG, Chuang J, Spencer-Segal JL, Amso D, Altemus M, McEwen BS, et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (Valine66Methionine) polymorphism contributes to developmental and estrous stage-specific expression of anxiety-like behavior in female mice. *Biol Psychiatry*. 2012;72:499–504.
- Yin LH, Shen H, Diaz-Ruiz O, Backman CM, Bae E, Yu SJ, et al. Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci*. 2012;13:120.
- Shen H, Luo Y, Kuo CC, Deng X, Chang CF, Harvey BK, et al. 9-Cis-retinoic acid reduces ischemic brain injury in rodents via bone morphogenetic protein. *J Neurosci Res*. 2009;87:545–55.
- Paban V, Manrique C, Filali M, Maunoir-Regimbal S, Fauvel F, Alescio-Lautier B. Therapeutic and preventive effects of methylene blue on Alzheimer's disease pathology in a transgenic mouse model. *Neuropharmacology*. 2014;76(Pt A):68–79.
- Mangano K, Dati G, Quattrocchi C, Proietti L, Mazzarino C, Di Marco R, et al. Preventive and curative effects of cyclophosphamide in an animal model of Guillain Barre syndrome. *J Neuroimmunol*. 2008;196:107–15.
- Lee Y, Fu C, Chiang B. Administration of interleukin-12 exerts a therapeutic instead of a long-term preventive effect on mite Der p I allergen-induced animal model of airway inflammation. *Immunology*. 1999;97:232–40.
- Jung S, Zielasek J, Kolner G, Donhauser T, Toyka K, Hartung HP. Preventive but not therapeutic application of Rolipram ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol*. 1996;68:1–11.
- McGlashan TH, Zipursky RB, Perkins D, Addington J, Miller T, Woods SW, et al. Randomized, double-blind trial of olanzapine versus placebo in patients prodromally symptomatic for psychosis. *Am J Psychiatry*. 2006;163:790–9.
- Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I. Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2011;37:1257–69.
- Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276:460–6.
- Gourgiotis I, Kampouri NG, Koulouri V, Lempeis IG, Prasinou MD, Georgiadou G, et al. Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102:507–14.
- Michenfelder JD, Milde JH. The interaction of sodium nitroprusside, hypotension, and isoflurane in determining cerebral vasculature effects. *Anesthesiology*. 1988;69:870–5.
- Armstead WM, Kiessling JW, Kofke WA, Vavilala MS. SNP improves cerebral hemodynamics during normotension but fails to prevent sex dependent impaired cerebral autoregulation during hypotension after brain injury. *Brain Res*. 2010;1330:142–50.
- Coyle JT. Nitric oxide and symptom reduction in schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:664–5.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Co-administration of nitric oxide (NO) donors prevents haloperidol-induced orofacial dyskinesia, oxidative damage and change in striatal dopamine levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;91:423–9.
- Naylor GJ, Martin B, Hopwood SE, Watson Y. A two-year double-blind crossover trial of the prophylactic effect of methylene blue in manic-depressive psychosis. *Biol Psychiatry*. 1986;21:915–20.

42. Joca SR, Guimaraes FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;185:298–305.
43. Callaway NL, Riha PD, Bruchey AK, Munshi Z, Gonzalez-Lima F. Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77:175–81.
44. Soyka M, Koch W, Moller HJ, Ruther T, Tatsch K. Hypermetabolic pattern in frontal cortex and other brain regions in unmedicated schizophrenia patients. Results from a FDG-PET study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2005;255:308–12.
45. Vollenweider FX, Leenders KL, Scharfetter C, Antonini A, Maguire P, Missimer J, et al. Metabolic hyperfrontality and psychopathology in the ketamine model of psychosis using positron emission tomography (PET) and [¹⁸F] fluorodeoxyglucose (FDG). *Eur Neuropsychopharmacol*. 1997;7:9–24.
46. Siepmann M, Kirch W. Effects of nitroglycerine on cerebral blood flow velocity, quantitative electroencephalogram and cognitive performance. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:832–7.
47. Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Shao Y, Li G. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;45:47–53.
48. Yu SY, Gao R, Zhang L, Luo J, Jiang H, Wang S. Curcumin ameliorates ethanol-induced memory deficits and enhanced brain nitric oxide synthase activity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;44:210–6.
49. Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, Engelmann M, Singewald N, Lubec G, et al. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide*. 2004;10:130–40.
50. Tadaiesky MT, Andreatini R, Vital MA. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;535:199–207.
51. Zhang LM, Zhou WW, Ji YJ, Li Y, Zhao N, Chen HX, et al. Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232:663–72.
52. Ionescu DF, Luckenbaugh DA, Niciu MJ, Richards EM, Slonena EE, Vande Voort JL, et al. Effect of baseline anxious depression on initial and sustained antidepressant response to ketamine. *J Clin Psychiatry*. 2014;75:e932–8.
53. Murrough JW. Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91:303–9.
54. Tomaz VS, Cordeiro RC, Costa AM, de Lucena DF, Nobre Junior HV, de Sousa FC, et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience*. 2014;268:236–46.
55. Manosso LM, Neis VB, Moretti M, Daufenbach JF, Freitas AE, Colla AR, et al. Antidepressant-like effect of alpha-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF-alpha. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;46:48–57.
56. Pitsikas N, Zisopoulou S, Sakellaris N. Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. *J Neurosci Res*. 2006;84:299–305.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

ANEXO II: FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 102/2012, sobre a aula *“Modelo animal de epilepsia e psicose comórbida: aspectos neuropatológicos, comportamentais e modulação pelo tratamento com nitroprussiato de sódio.”*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jaime Eduardo Cecílio Hallak** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de agosto de 2012.

(We certify that the protocol nº 102/2012, about *“Animal models of epilepsy and comorbid psychosis: neuropathological features, behavioural aspects and modulation by treatment with sodium nitroprusside”*, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 08/27/2012.

Ribeirão Preto, 27 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

FICHA CATALOGRÁFICA

Balista, Priscila Alves

MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA E PSICOSE COMÓRBIDA: ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS, COMPORTAMENTAIS E MODULAÇÃO PELO TRATAMENTO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO. Ribeirão Preto, 2016.

137 páginas

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia/Neurociências.

Orientador: Jaime Eduardo Cecílio Hallak

1. Psicose. 2. Epilepsia. 3. Modelo animal. 4. Comorbidade psiquiátrica. 5. Quetamina. 6. Pilocarpina. 7. Nitroprussiato de Sódio