



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TRAXOPRODIL ATENUA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Villa Martignoni

Santa Maria, RS, Brasil

2010

TRAXOPRODIL ATENUA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL

Por

Felipe Villa Martignoni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**TRAXOPRODIL ATENUA AS CONVULSÕES INDUZIDAS
POR PENTILENOTETRAZOL**

Elaborada por
Felipe Villa Martignoni

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Fernando Mello (UFSM)

Prof. Dra. Michele Rechia Fighera (ULBRA)

Prof. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros (MACKENZIE)

Santa Maria, 23 de setembro de 2010

“E se os homens vierem a mim, mostrar-lhes-ei sua fraqueza. E dou a fraqueza aos homens a fim de que sejam humildes; e minha graça basta a todos os que se humilham perante mim; porque caso se humilhem perante mim e tenham fé em mim, então farei com que as coisas fracas se tornem fortes para eles.”

Éter 12:27

O Livro de Mórmon

Dedicatória

À minha família, em especial aos meus pais,
Waldir Pedro Martignoni e Beatrix N. Villa Martignoni,
que seus esforços para adquirir conhecimento sejam notados por
todas as gerações da Família Martignoni.

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, ao nosso Pai Celestial, por mostrar-me as minhas imperfeições e auxiliar-me a corrigí-las. Dando-me ânimo para persistir no Seu caminho com alegria e senso de humor.

Aos meus amados, Janaína T. G. Martignoni e Pedro G. Martignoni que tiveram que sacrificar seu tempo e conforto para que eu pudesse obter mais conhecimento e concluir esse trabalho.

Aos meus pais, pelo imenso cuidado comigo e minha família, por deixarem o exemplo perfeito de honestidade, trabalho árduo, amor incondicional e espiritualidade. Agradeço também pelos recursos prontamente oferecidos para que eu conseguisse progredir nos estudos.

Às minhas irmãs, cunhada e suas famílias por serem exemplos de carinho e por sempre torcer pelo meu sucesso.

A toda família Villa e Martignoni, em especial ao meu avô José Miguel Martignoni que sempre incentivou-nos a estudar.

Ao meu orientador Carlos Fernando Mello, pela oportunidade de fazer este mestrado, e por seus preciosos conselhos para uma vida plena.

Aos amigos e professores Mauro Schneider de Oliveira e Ana Flávia Furian que sempre estiveram presentes para ouvir, corrigir, incentivar e além disso, ensinar ciência.

Aos amigos do LABNEURO, por alegrar os momentos de convívio no laboratório, e pelas inúmeras vezes que dependi de sua ajuda e vocês estiveram lá para dar uma mão.

Aos professores da UFSM, que contribuíram para minha formação como médico e mestre.

À UFSM por providenciar um curso de graduação e pós-graduação de qualidade.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e realização desta dissertação.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

TRAXOPRODIL ATENUA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL

Autor: Felipe Villa Martignoni
Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira
Local e data da Defesa: Santa Maria, 23 de setembro de 2010.

Há evidências de que as poliaminas facilitam convulsões por modular positivamente os receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr), e que os antagonistas seletivos a subunidade NR2B do NMDAr têm atividade anticonvulsivante. Entretanto, permanece indeterminado se o traxoprodil (CP-101,606), um análogo do ifenprodil que age como antagonista seletivo na subunidade NR2B do NMDAr, tem efeito anticonvulsivante. Neste estudo investigamos se o traxoprodil altera as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos Wistar machos por meio de métodos comportamentais e eletroencefalográficos (EEG). Espermidina (SPD) (2 nmol/sítio; i.c.v.) facilita as convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por doses subconvulsivantes de PTZ (35 mg/kg; i.p.), mas não altera a atividade convulsiva induzida por dose plenamente convulsivante de PTZ (70 mg/kg; i.p.). Traxoprodil (20 nmol i.c.v.) aumenta a latência para convulsão tônico-clônica generalizada induzida por PTZ (70 mg/kg; i.p.). A administração oral de traxoprodil (60 mg/kg) aumenta as latências para convulsão clônica e tônico-clônica generalizada e diminui a duração total das convulsões induzidas por PTZ (70 mg/kg; i.p.). Esses dados mostram que o traxoprodil diminui as convulsões induzidas por PTZ, um modelo animal com bom poder de predição de atividade convulsivante em humanos, e sugerem um papel para a subunidade NR2B nas convulsões induzidas por PTZ. Enquanto mais estudos são necessários para determinar se o traxoprodil tem, de fato, atividade anticonvulsivante na clínica, as subunidades NR2B podem representar um novo alvo para o desenvolvimento de drogas anticonvulsivantes.

Palavras chave: Traxoprodil; NR2B; CP-101,606; Poliaminas; espermidina; convulsões; PTZ.

ABSTRACT

Masters dissertation
Graduate Program in Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

TRAXOPRODIL ATTENUATES PENTYLENETETRAZOL- INDUCED SEIZURES

Author: Felipe Villa Martignoni
Advisor: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co- advisor: Prof. Dr. Mauro Schneider de Oliveira
Date and Place of the Defense: Santa Maria, 23 de September de 2010.

There is evidence that while polyamines facilitate seizures by positively modulating N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr), selective antagonists of the NR2B-subunit decrease seizures. However, it remains undetermined whether traxoprodil (CP-101,606), an ifenprodil analog that acts as a selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDAr, decreases seizure activity. In the current study we investigated whether traxoprodil alters PTZ-induced seizures in adult male Wistar rats by behavioral and electroencephalographical methods. Spermidine (SPD) (2 nmol/site; i.c.v.) facilitated behavioral and electroencephalographical seizures induced by a normally subeffective dose of PTZ (35 mg/kg; i.p.), but did not alter seizure activity induced by convulsant dose of PTZ (70 mg/kg; i.p). Traxoprodil (20 nmol i.c.v.) increased the latency to generalized tonic-clonic seizures induced by PTZ (70 mg/kg; i.p). The oral administration of traxoprodil (60 mg/kg) increased the latency to clonic and tonic-clonic seizures, and decreased total time spent in seizures. These data constitute pharmacological evidence supporting a role for NR2B subunit in PTZ-induced seizures. While more studies are necessary to determine whether traxoprodil is a useful anticonvulsant in clinical settings, NR2B subunits may represent new targets of drug development for convulsive disorders.

Keywords: Traxoprodil; NR2B; CP-101,606; Polyamines; spermidine; seizures; PTZ.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Glutamato

Figura 1- Metabolismo do glutamato 22

Figura 2- Receptores glutamatérgicos 23

3.2 Receptor NMDA

Figura 3- Estrutura do NMDAr 24

Figura 4- Domínios extracelulares do NMDAr 26

Figura 5- Estrutura química das poliaminas 28

Figura 6- Interação das Poliaminas com o NMDAr 30

Figura 7- Estrutura química do Ifenprodil e do Traxoprodil 36

4 – CAPÍTULO

4.1 MANUSCRITO

Figure 1. Representative EEG recordings of rats injected with vehicle (0.85% NaCl, 2 μ l/site; i.c.v., A-C) or SPD group (2 nmol/site; i.c.v., D-F). In all traces the arrow indicates PTZ (35 mg/kg) administration. EEG traces delimited by boxes B, C, E and F are shown in detail in B, C, E and F recordings. **57**

Figure 2. Traxoprodil (0.2, 2 or 20 nmol/site, i.c.v.) has no effect on the latency to clonic (A), but increases the latency to generalized seizures (B) induced by PTZ (70 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis test). Data are median and interquartile ranges for $n = 4-11$ in each group. Representative EEGs of vehicle- (0.85% NaCl, C-E) and traxoprodil-injected animals (20 nmol/site; i.c.v., F-H). The arrow indicates PTZ administration. EEG recordings delimited by boxes D, G and E, H are respectively associated with clonic and generalized tonic-clonic seizures, whose expanded views are shown in D, E, G and H recordings. **58**

Figure 3. Representative EEG recordings of rats injected with vehicle (0.85% NaCl, 2 μ l/site; i.c.v., A-C) or traxoprodil (60 mg/kg, p.o., D-F) showing respective clonic (boxes B and E) and generalized tonic –clonic seizures (boxes C and F) induced by PTZ (70 mg/kg, i.p). EEG traces delimited by boxes B, C, E and F are shown in detail in B, C, E and F recordings, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ (70 mg/kg i.p.) administration..... **61**

Table 1. Effect of spermidine (2 nmol/site; i.c.v.) and PTZ (35 mg/kg), on the latency to clonic and generalized tonic-clonic seizures..... **56**

Table 2. Effect of Traxoprodil (60 mg/kg, p.o.) on the latency to clonic, generalized tonic–clonic seizures and time spent in generalized seizures induced by PTZ (70 mg/kg, i.p.)..... **60**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AAE – aminoácidos excitatórios
- ABD – domínio de ligação do agonista
- ADCI - [+/-]-5-aminocarbonil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino
- AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- ANOVA- análise de variância
- AVE – acidente vascular encefálico
- Ca²⁺- cálcio
- CAMKII – cálcio-calmodulina II
- CP-101,606 – traxoprodil
- D-CPP- (3-(2-carboxipiperazine-4-il) propil-1-fosfato)
- EEG- eletroencefalograma
- GABA- ácido γ -aminobutírico
- i.c.v. – intracerebroventricular
- K⁺ - potássio
- kg- quilograma
- MAGUK – guanilato quinase associada a membrana
- mg- miligrama
- Mg²⁺ - magnésio
- MK-801 – dizocilpina
- Na⁺- sódio
- NMDA- N-metil-D-aspartato
- nmol- nano mol
- nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
- NTD – domínio N-terminal
- OMS- Organização Mundial de Saúde
- PDZ - densidade pós-sinápticas 95 (PSD95), grande disco supressor de tumor de *Drosophila* (DlgA) , proteína de zona de oclusão-1 (zo-1)
- pH - potencial hidrogeniônico
- PKC – proteína quinase C
- PLC – Fosfolipase C
- PSD 95 – densidade pós-sinápticas 95

PTZ- pentilenotetrazol

R Glu i – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

R Glu m - receptores glutamatérgicos metabotrópicos

RNA- ácido ribonucleico

SAP-102 – proteína associada a sinápsse 102

SCN 1 e 2 – canais de Na⁺ voltagem dependente 1 e 2.

SNC – sistema nervoso central

SPD – espermidina

TCE – traumatismo crânio-encefálico

v.o. – via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 GLUTAMATO	22
3.2 RECEPTOR <i>N</i>-METIL-D-ASPARTATO (NMDAr)	23
3.2.1 Estrutura do NMDAr	23
3.2.2 A composição do NMDAr e sua localização	24
3.2.3 Domínios extracelulares do NMDAr e seus moduladores	26
3.2.4 O canal iônico do NMDAr	31
3.2.5 O terminal-C do NMDAr	31
3.2.6 NMDAr e epilepsia	32
3.2.7 Antagonistas NMDAr e seu efeito anticonvulsivante	33
3.3 EPILEPSIA	36
3.4 DROGAS ANTICONVULSIVANTES	38
4. CAPÍTULO	41
4.1 MANUSCRITO	41
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **CAPÍTULO**. Nesse item, está o manuscrito do artigo, submetido para a publicação. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliográficas**, encontram-se no **CAPÍTULO** e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** E **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença heterogênea caracterizada pela recorrência de crises convulsivas que, freqüentemente, apresenta-se por atividade neuronal excessiva ou sincrônica que leva a sinais e ou sintomas transitórios (Berg et al. 2010). A epilepsia, depois do acidente vascular encefálico, é a doença neurológica mais comum em humanos, com uma prevalência de 1-2% (Dichter et al. 2007). Muitas vezes, é de origem desconhecida, embora ela possa desenvolver-se após um dano cerebral, como trauma crânio-encefálico, infecção, abuso de drogas ou crescimento tumoral (Berg et al. 2010). O sistema de classificação da epilepsia sofreu diversas modificações desde sua criação em 1960, hoje é baseado nas características clínicas das crises convulsivas, associadas ou não aos achados eletroencefalográficos (para revisão ver Berg et al. 2010). As crises convulsivas são primariamente divididas em parciais (sinônimo de focais) ou generalizadas. As crises parciais são aquelas nas quais a atividade convulsiva está restrita a uma área discreta do cérebro. As crises generalizadas envolvem regiões difusas e simultâneas de ambos os hemisférios do encéfalo (Berg et al. 2010).

Durante as últimas décadas o tratamento da epilepsia obteve progresso considerável, incluindo a introdução de vários novos agentes e novas formulações de drogas antigas (Bazil and Pedley 1998; McCabe 2000; Perucca et al. 2007). Entretanto, em torno de 25-30% dos pacientes permanecem sem o controle adequado das crises com a monoterapia ou com a associação de fármacos (Ben-Menachem et al. 2007).

Dentre os vários sintomas da epilepsia crônica, encontra-se a deterioração cognitiva como a perda da memória e dificuldade de concentração (Elger et al. 2004; Mataro-Serrat and Junque-Plaja 1997; Taylor et al. 2010). Freqüentemente, os anticonvulsivantes clássicos e de segunda geração exacerbam os déficits cognitivos (Loring and Meador 2001; Thierer 2001). Por essa razão, muitos esforços têm sido envidados para encontrar droga que não reduza a capacidade intelectual do usuário e controle as crises convulsivas de forma eficaz (Meador 2008; Mula and Monaco 2009).

Tem sido proposto que os aminoácidos excitatórios, como o glutamato, estão envolvidos na gênese e propagação das convulsões (Loscher 2002). O glutamato exerce sua função excitatória pela ativação de receptores glutamatérgicos que se distinguem em dois subtipos, especificamente: 1. os receptores ligados a canais iônicos (NMDA, AMPA e cainato); e 2. receptores metabotrópicos acoplados a uma proteína G. Desde a

sua descoberta, a disfunção dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) está relacionada a patogênese da epilepsia (Parsons et al. 1998; Rogawski 1992), pois esses receptores têm papel fundamental na propagação de sinapses excitatórias (Loftis and Janowsky 2003; Mony et al. 2009a). Com a evolução das técnicas de biologia molecular aumentou-se o conhecimento a respeito da estrutura do NMDAr. Os NMDAr são canais catiônicos, modulados por ligantes, compostos por complexos heteroméricos derivados de três famílias de subunidades (NR1, 2 e 3). A subunidade NR1 (por sua vez subdividida em A e B) possui um sítio de ligação para glicina e está sempre associada a uma subunidade NR2 (subdividida de A-D) que possui um sítio de ligação para o glutamato. Em alguns casos há também a associação da subunidade NR1 ou NR1/NR2 com uma subunidade NR3 (A e B) que também possui um sítio de ligação para glicina (Chatterton et al. 2002; Ishii et al. 1993; Monyer et al. 1992). A combinação dessas subunidades confere aos receptores funções distintas e localização variada no SNC. Em contraste com a família NR1, os constituintes da família NR2 (A-D) possuem grande diferença em sua função e localização. A subunidade NR2B tem importante participação na patofisiologia de várias doenças degenerativas como as doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson, dor neuropática e epilepsia (Hironaka and Niki 2000; Li et al. 2003; Snyder et al. 2005; Tan et al. 2005; Wang and Shuaib 2005).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, por participarem na base patofisiológica da epilepsia, são alvos para novos fármacos anticonvulsivantes (Perucca et al. 2007; Pollard and French 2006). No passado, a ação anticonvulsivante de potentes bloqueadores do canal iônico do NMDAr foi testada em humanos, porém devido a efeitos colaterais limitantes, como o distúrbio dissociativo, essa classe de drogas foi proscrita para o uso clínico em pacientes portadores de epilepsia (Löscher 1998; Sveinbjornsdottir et al. 1993). Todavia, novas descobertas sobre a função, expressão, localização e interação dos NMDAr levaram ao desenvolvimento de fármacos seletivos a subunidade NR2B, como o traxoprodil, que induzem efeitos colaterais muito menos intensos do que aqueles induzidos pelos antagonistas NMDA não-seletivos, como MK-801 (Guscott et al. 2003; Nutt et al. 2008; Preskorn et al. 2008). O protótipo dos antagonistas NR2B do NMDAr, o ifenprodil, foi inicialmente caracterizado como um antagonista competitivo do sítio para poliaminas no NMDAr. Entretanto, existe uma interação alostérica não-competitiva entre ifenprodil e as poliaminas, pois eles ligam-se em sítios distintos e interagem de uma forma alostérica negativa, sendo que a ligação da

espermina diminui a afinidade do ifenprodil pelo receptor e vice-versa (Kew and Kemp 1998).

As poliaminas, espermidina, espermina e putrescina, são um grupo de aminas alifáticas com estrutura policatiônica, que em pH fisiológico possuem uma carga positiva em cada átomo de nitrogênio (Carter 1994; Williams 2009). O excesso de ativação do NMDAr por poliaminas induz a um estado hiperexcitável levando à mioclonias e morte (Kirby and Shaw 2004). De fato, pacientes com epilepsia do lobo temporal farmacologicamente intratável, que sofreram tratamento cirurgico para controlar as crises epiléticas, apresentam altos níveis de espermidina nas regiões ictais excisadas e de espermina nas regiões de propagação no córtex temporal (Laschet et al. 1999). Em concordância com essas observações, a administração de espermina e espermidina aumenta as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista GABA_A, sugerindo que as poliaminas tem um papel importante na patogênese da epilepsia (Kaasinen et al. 2003; Kirby and Shaw 2005). Contribuindo com esses dados, um número considerável de estudos demonstrou o efeito anticonvulsivante de antagonistas NR2B de primeira geração, em vários modelos animais em camundongos e ratos (De Sarro and De Sarro 1993; Doyle and Shaw 1996; McAllister 1992; Zarnowski et al. 1994) e pelo menos um estudo mostrou o efeito do traxoprodil sobre a iniciação e propagação da depressão alastrante cortical induzida eletricamente (Menniti et al. 2000).

Foram concluídos estudos de fase II usando o traxoprodil como tratamento de várias doenças do SNC. Tais estudos investigaram seu potencial terapêutico para a Doença de Parkinson, Depressão refratária e trauma crânio encefálico (Nutt et al. 2008; Preskorn et al. 2008; Yurkewicz et al. 2005). Além disso, nesses estudos o traxoprodil apresentou um bom perfil de segurança e alta tolerabilidade. Apesar de estudos encontrarem resultados controversos, chama atenção o fato de que o traxoprodil causa pouco impacto sobre as funções cognitivas, como aprendizado e memória, diferente de outros antagonistas NMDA não seletivos como o MK-801 (Gomes et al. 2010; Guscott et al. 2003; Higgins et al. 2005; Walker and Davis 2008).

Até o momento, não há estudos descrevendo se o traxoprodil apresenta efeito anticonvulsivante no modelo de convulsão aguda induzida pelo PTZ, um modelo animal de convulsão de alto valor preditivo para eficácia em humanos. Neste estudo foi investigado o efeito do traxoprodil sobre as convulsões induzidas por PTZ.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

2.1.1 Avaliar o envolvimento da subunidade NR2B do receptor NMDA, nas convulsões induzida por PTZ em ratos Wistar machos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar, por meio de estudos de EEG e comportamento, se a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de espermidina potencializa as convulsões induzidas por PTZ.

2.2.2 Investigar, por meio de estudos de EEG e comportamento, se a administração i.c.v. de traxoprodil previne as convulsões induzidas por PTZ.

2.2.3 Investigar, por meio de estudos de EEG e comportamento, se a administração via oral (v.o.) de traxoprodil previne as convulsões induzidas por PTZ.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GLUTAMATO

O glutamato é um aminoácido que está distribuído amplamente no corpo humano, porém, sua concentração é mais elevada no SNC do que qualquer outro tecido (Watkins and Jane 2006). O glutamato do SNC deriva da glicose (através do ciclo de Krebs) e da glutamina, que é sintetizada pelas células gliais e captada pelos neurônios. Ele também tem um importante papel metabólico, participa do ciclo tricarboxílico através da interconversão de glutamato a α -cetogluturato, que ocorre por meio das enzimas transaminases, conforme mostrado na Figura 1.

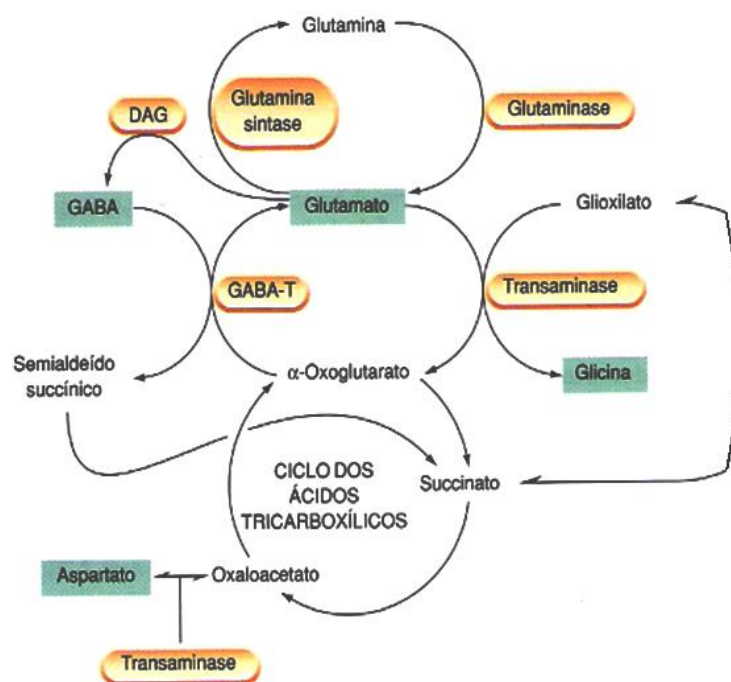


Figura1- Metabolismo do glutamato. Fonte: modificado de Rang & Dale 6ª Ed, 2007

Em comum com outros neurotransmissores, após sua síntese, o glutamato é transportado para vesículas e armazenado para posteriormente ser liberado na fenda sináptica, por exocitose dependente de Ca^{2+} . O efeito do glutamato é encerrado pela recaptação mediada por transportadores localizados nos terminais nervosos e nos astrócitos circunvizinhos.

Hoje o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos, exerce sua ação neurotransmissora ligando-se a receptores metabotrópicos (subdivididos em grupo I, II e III) e ionotrópicos (subdivididos em NMDA, AMPA e cainato), conforme mostrado na Figura 2.

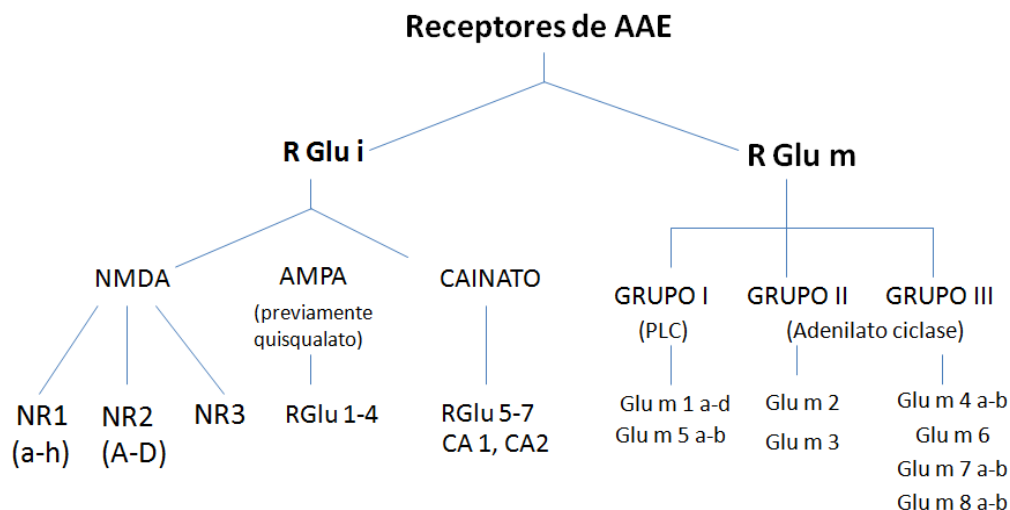


Figura 2- Receptores glutamatérgicos. Fonte: modificado de Watkins & Jane, 2006

Nesse ínterim, os receptores ionotrópicos do subtipo NMDA, AMPA e cainato desempenham um papel importante na transmissão excitatória rápida, e têm sido apontados como fundamentais em diversos processos fisiológicos, como aprendizado, memória (Loftis and Janowsky 2003) e modulação do afeto (Barkus et al. 2010), e em processos patológicos, como a morte celular por hipóxia/isquemia (Obrenovitch et al. 2000) e epilepsia (Löscher 1998).

3.2 RECEPTOR *N*-METIL-D-ASPARTATO (NMDAr)

3.2.1 Estrutura do NMDAr

O NMDAr é um complexo protéico com vários sítios de ligação para agonistas e antagonistas, tais como glutamato/NMDA, sítio onde se liga dizocilpina (MK-801), sítio modulatório para a glicina (coagonista do receptor NMDA), ifenprodil e zinco, bem como sítios de ligação para poliaminas (Ransom and Stec 1988; Riedel et al. 2003; Singh et al. 1990; Williams 2009). Funcionalmente, o NMDAr é um canal catiônico

modulado pelo glutamato (Figura 3) (Hardingham 2009), mas que também induz ações intracelulares mediadas por mecanismos independentes do fluxo iônico. O receptor NMDA está presente nos neurônios, oligodendrócitos, astrócitos (Verkhratsky and Kirchhoff 2007), e também em células não neuronais, como condrócitos (Ramage et al. 2008) e osteoclastos (Szczesniak et al. 2005), onde possuem função menos conhecidas.

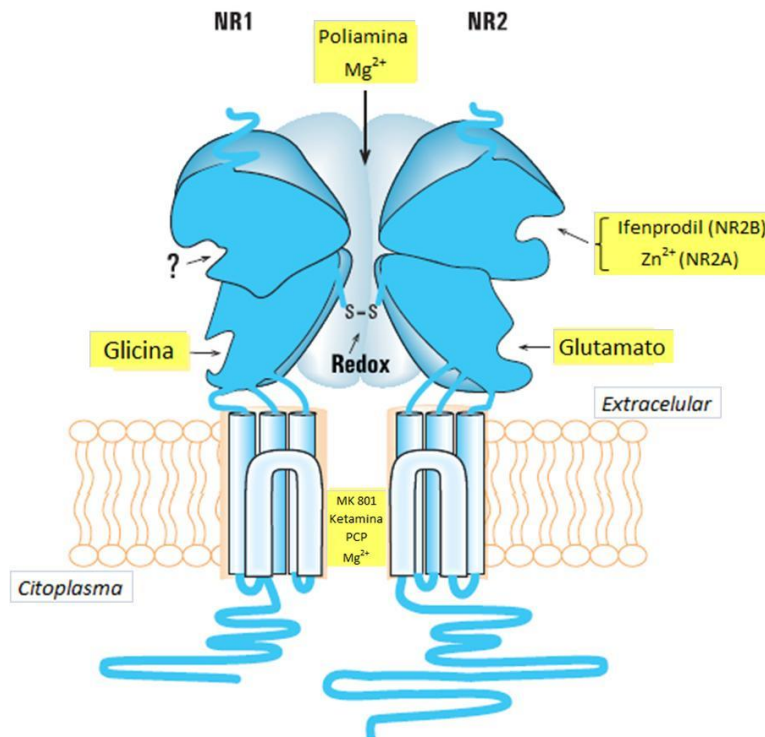


Figura 3- Estrutura do NMDAr. Fonte: modificado de Kemp & McKernan, 2002

3.2.2 A composição do NMDAr e sua localização

NMDAr é amplamente distribuído no sistema nervoso central, sendo sua expressão máxima na região CA1 do hipocampo (Monaghan and Cotman 1985). Diversas linhas de evidência apontam que os NMDAr são complexos heteroméricos compostos por 4 subunidades derivadas de três famílias relacionadas: NR1, NR2 e NR3: A subunidade NR1, que é um componente ubíquo dos NMDAr, distingue-se em oito (NR1a-h) subtipos, que são gerados por processamento (*splicing*) alternativo do RNA mensageiro de um único gene (Dingledine et al. 1999; Watkins and Jane 2006). Nesta subunidade encontra-se o sítio de ligação para glicina; a subunidade NR2 (A-D), que possui os sítios de ligação para o glutamato, zinco, poliaminas e ifenprodil. Assim como

a subunidade NR1, a subunidade NR3(A-B), também apresenta um sítio de ligação para a glicina. A heterogeneidade do NR2 e NR3 é conferida pela expressão de 6 genes distintos (Dingledine et al. 1999). Um NMDAr funcional, responsivo ao glutamato e à glicina, necessariamente requer a presença de, pelo menos, uma subunidade NR1 e uma subunidade NR2 (Monaghan and Jane 2009), a diversidade da expressão das subunidades em várias combinações, confere ao NMDAr funções e propriedades farmacológicas distintas (Chatterton et al. 2002; Prybylowski and Wenthold 2004).

No encéfalo maduro, a expressão dos RNAm das subunidades NR2A-D varia de acordo com a estrutura do SNC. Em pesquisas prévias (Ishii et al. 1993), utilizou *northern blot* e análise de hibridização *in situ* para demonstrar que as subunidades NR2A e NR2B eram abundantes no córtex e hipocampo, NR2C no cerebelo e NR2D em áreas subcorticais. Entretanto, novas pesquisas conseguiram quantificar a expressão de cada subunidade em estruturas separadas. Goebel and Poosch (1999) sugerem a seguinte classificação para a quantificação da expressão da subunidade NR2B no SNC de ratos: córtex > bulbo olfatório > hipocampo > estriado > colículo superior > colículo inferior > tronco encefálico > retina \geq cerebelo > hipotálamo.

Nenhuma das subunidades NR2(A-D) podem ligar-se entre si para constituir um NMDAr funcional. Entretanto, quando co-expressas com uma subunidade NR1 formam um receptor ativo. A combinação de NR1 com NR2B forma um heterômero altamente permeável ao Ca^{2+} , e bloqueado por Zn^{2+} , MK-801 e Mg^{2+} , de maneira voltagem dependente. Além disso, este receptor é co-ativado por glutamato e glicina (McBain and Mayer 1994). Todas as subunidades do NMDA compartilham do mesmo esquema estrutural, são organizadas em quatro módulos (Mayer 2006; Paoletti and Neyton 2007), conforme mostrado na Figura 4. Na região extracelular encontra-se dois grandes domínios do NMDAr: o domínio terminal-N (NTD) e o domínio de ligação do agonista (ABD, onde se liga a glicina no NR1 e o glutamato no NR2). Além desses dois domínios extracelulares, existe uma região da membrana que comporta três segmentos transmembrana (TM 1,3 e 4) com uma reentrância formando uma alça no poro central do canal iônico (M2) (assemelha-se a um canal de K^+ invertido), uma alça extracelular entre TM3 e TM4. E finalmente, o NMDAr possui uma região intracelular chamada de terminal-C, que varia de tamanho de acordo com o tipo da subunidade. O terminal-C provém a interação com numerosas proteínas citoplasmáticas, ele delimita a localização

do receptor na célula e apresenta um papel essencial na modulação da ação do receptor (Dingledine et al. 1999; Mayer 2006).

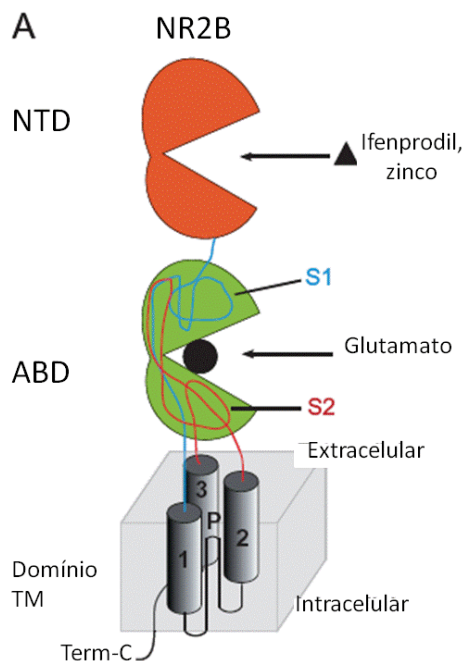


Figura 4- Domínios extracelulares do NMDAr. Fonte: modificado de Mony et al. 2009a

3.2.3 Domínios extracelulares do NMDAr e seus moduladores

Os dois domínios extracelulares do NMDAr, o NTD e o ABD têm estruturas homólogas a proteínas periplásmicas de bactérias Gram negativas, essas proteínas são essenciais para o transporte transmembrana de uma variedade de compostos de baixo peso molecular. Os 380 primeiros aminoácidos do NTD estão relacionados a proteínas de ligação da leucina isoleucina valina (O'Hara et al. 1993; Paoletti et al. 2000), e possui um papel essencial na montagem do receptor (Herin and Aizenman 2004). Na subunidade NR2A e NR2B, o NTD também forma um domínio regulatório que contém um sítio de ligação para antagonistas alóstericos, como o ifenprodil no NR2B e zinco no NR2A (Masuko et al. 1999; Paoletti et al. 2000). O ABD tem estrutura homóloga à proteína ligadora de glutamina, que também é uma proteína de transporte de bactérias gram negativas, e assim como o NTD presume-se que também possui uma estrutura semelhante a uma concha de ostra aberta (Mony et al. 2009a). O ABD é formado por dois segmentos, S1 e S2, ligados ao canal iônico.

Entre os segmentos S1 e S2 do ABD encontram-se os sítios de ligação para glicina e glutamato nas subunidades NR1 e NR2, respectivamente (Furukawa et al. 2005). Na fenda da “concha” dessas estruturas liga-se o agonista, fechando os lobos (aproximando os dois segmentos) e estabilizando-a na conformação fechada. Os antagonistas agem na mesma fenda, porém impedem o fechamento dos lobos, prevenindo a ativação do canal (Furukawa and Gouaux 2003).

No NMDAr funcional os ABDs de cada subunidade formam dímeros através da união da parte posterior do S1. Assim, quando ocorre um fechamento induzido por um agonista em uma das subunidades a tensão é transduzida para o ABD de outra subunidade causando a abertura do canal (Mayer 2006; Mony et al. 2009a). A quebra da interface dos dímeros de ABD leva à perda da tensão e ao fechamento do canal. Este processo ocorre através do antagonismo alostérico por prótons ou ligantes do domínio N-terminal do NMDAr, como o ifenprodil (Gielen et al. 2008).

Os domínios N-terminais das subunidades NR2A e NR2B formam sítios modulatórios de ligação para antagonistas não competitivos altamente seletivos. Até o momento, o zinco tem sido descrito como o único ligante do NTD da subunidade NR2A (Paoletti et al. 2000). O ifenprodil liga-se ao interlobo do NTD da subunidade NR2B (Mony et al. 2009b; Perin-Dureau et al. 2002), próximo à sua “dobradiça” (Mony et al. 2009b), interagindo com resíduos dos dois lobos e promovendo o seu fechamento. (Mony et al. 2009b) também propõe que o fechamento do NTD provoca uma tensão aos ABDs, levando a uma separação da interface dos dímeros, causando a perda da tração de segmentos transmembrana que, junto com a ligação de prótons, leva ao fechamento do canal iônico, conforme mostrado na Figura 6.

Prótons extracelulares (H^+) são potentes antagonistas dos NMDAr. Seu efeito é voltagem-independente e não competitivo, indicando que não agem como bloqueadores do canal iônico (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004; Mony et al. 2009a). Em condições normais, aproximadamente 50% dos NMDAR NR1/NR2B estão sob inibição protônica (Mony et al. 2009a). Sugere-se que pequenas alterações do pH extracelular podem alterar significativamente a corrente pelo canal iônico do NMDAr. Por outro lado, a elevação endógena transitória do pH, que ocorre após ativação neuronal, pode potencializar a resposta pós-sináptica do NMDAr na região CA1 do hipocampo (Makani and Chesler 2007). Como consequência da inibição protônica do NMDAr a acidose extracelular moderada que ocorre após a isquemia, ou convulsão tende a

minimizar os danos induzidos pelo glutamato (Dingledine et al. 1999; Giffard et al. 1990). Sabe-se que a sensibilidade aos prótons do meio extracelular é influenciada pelas subunidades NR1 e NR2. Porém, o seu sítio exato de ligação no receptor ainda é incerto (Masuko et al. 1999; Traynelis et al. 1995). A sensibilidade aos prótons da subunidade NR2B parece ser influenciada por diversos moduladores alostéricos do NMDAr, incluindo o ifenprodil e as poliaminas (Mott et al. 1998; Traynelis et al. 1995), conforme mostrado na Figura 6.

As poliaminas, putrescina, espermidina (SPD) e espermina, são aminas alifáticas simples constituídas por uma, duas ou três cadeias de carbono, respectivamente, como mostrado na Figura 5. Tais compostos são solúveis em água, possuem baixo peso molecular, e caráter fortemente básico, devido aos grupamentos amino que em pH fisiológico encontram-se completamente protonados (Carter 1994; Seiler et al. 1996). As poliaminas estão presentes em quase todas as células, e tem importante ação na síntese protéica, divisão e crescimento celular (Seiler et al. 1996; Williams 1997), encontrando-se amplamente distribuídas no encéfalo de mamíferos (Williams 2009).

As poliaminas modulam canais iônicos. Particularmente, bloqueiam canais de K^+ (Williams 1997), potencializam o efeito do glutamato nos receptores NMDA (Gallagher et al. 1997; Williams et al. 1990) os efeitos mediados por receptores GABA_A (Gilad et al. 1992; Laschet et al. 1992). Tais canais iônicos são de maior importância para os mecanismos de indução e propagação de crises convulsivas.

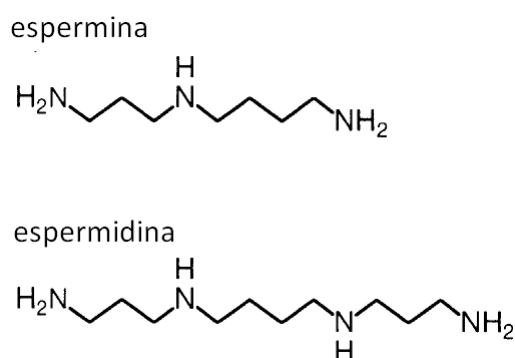


Figura 5- Estrutura química das poliaminas. Fonte: modificado de Williams, 1997.

Os efeitos endógenos das poliaminas intracelulares, espermina e espermidina, sobre os NMDAr, foram primeiramente observados em ensaios de ligação que evidenciaram que as poliaminas aumentam a ligação do [³H]MK-801, um bloqueador

do NMDAr que só se liga ao receptor quando este se encontra na conformação de canal iônico aberto (Ransom and Stec 1988). Foi, então, proposto que o sítio de ligação das poliaminas era distinto dos sítios desses bloqueadores (Williams et al. 1989). Trabalhos eletrofisiológicos subsequentes confirmaram quatro efeitos distintos da espermina sobre os NMDAr.

O primeiro efeito da espermina é de aumentar a corrente evocada por concentração saturante de glutamato e glicina, o assim chamado estímulo glicina-independente, somente visto nos receptores que expressam a subunidade NR1/NR2B (Williams 2009; Williams et al. 1990).

O segundo efeito sobre o NMDAr é o estímulo glicina-dependente, que ocorre na presença de concentrações subsaturantes de glicina. A espermina aumenta a afinidade da glicina pelo receptor, efeito distinto do glicina-independente, pois ocorre em receptores que expressam as subunidades NR1/NR2A e NR2B. Portanto, envolve um segundo sítio, distinto do anterior (Benveniste and Mayer 1993).

Um terceiro efeito da espermina é o de reduzir a afinidade do glutamato pela subunidade NR2B. Este efeito não é observado em outra subunidade a não ser na NR2B, e é provavelmente mediado pelo mesmo sítio de ligação responsável pelo efeito glicina-independente (Williams et al. 1994).

Um quarto efeito da espermina é o bloqueio voltagem-dependente do canal de cátion próximo, ou sobrepondo-se ao sítio de ligação de Mg^{2+} dentro do canal iônico (Araneda et al. 1999). Esse bloqueio voltagem-dependente tem sido descrito para diferentes canais catiônicos, incluindo alguns tipos de receptores AMPA, cainato e canais de K^+ (Bowie and Mayer 1995; Ficker et al. 1994).

(Gielen et al. 2008) sugerem dois mecanismos hipotéticos de como as poliaminas podem potencializar, e os prótons dessensibilizar os NMDAr contendo NR2B, conforme demonstrado na Figura 6.

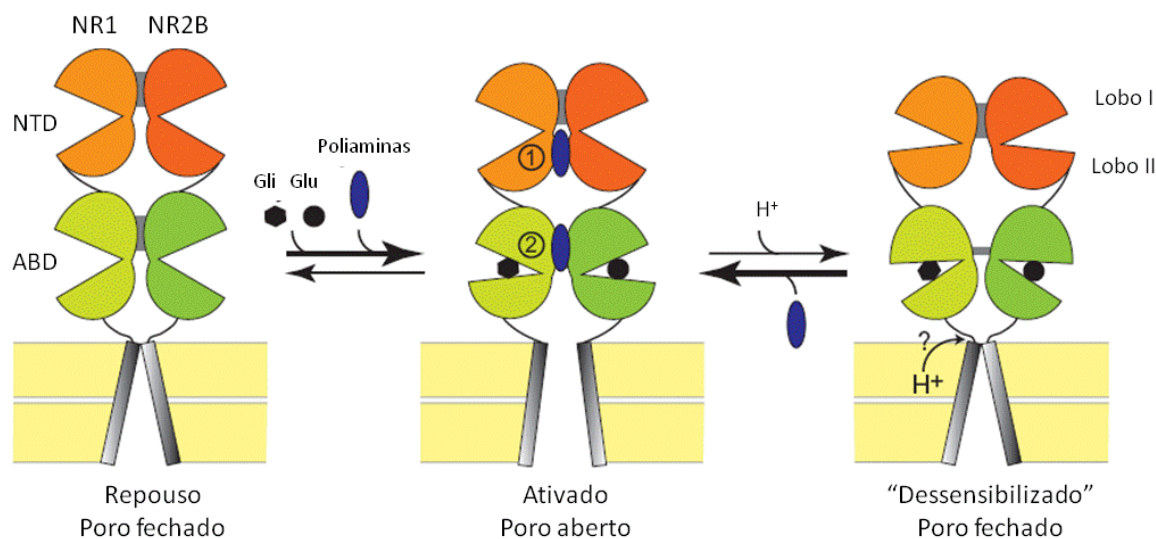


Figura 6- Interação das Poliaminas com o NMDAr. Fonte:modificado de Mony 2009a.

O NMDAr completo é um tetrâmero, contendo 2 subunidades NR1 e duas NR2. Entretanto, para facilitar a compreensão, na Figura 6 está representado somente um dímero NR1/NR2B. Os NTDs podem inativar o NMDAr (induzir o fechamento do canal iônico) por separarem as interfaces dos dímeros de ABD.

Mecanismo 1: As moléculas de poliaminas ligam-se no lobo II do NTD entre as subunidades NR1 e NR2B, dificultando o fechamento do NTD e a separação das interfaces dos ABDs, levando à abertura do canal.

Mecanismo 2: As moléculas de poliaminas ligam-se e estabilizam as interfaces do dímero de ABD, dificultando o fechamento do canal.

Em ambos mecanismos, a ligação de prótons está diretamente associada à quebra da interface dos dímeros de ABD, estabilizando o canal em um estado “fechado”.

O papel das poliaminas extracelulares sobre o SNC ainda não está bem estabelecido. Entretanto, transportadores seletivos para poliaminas já foram identificados em neurônios e glia (Masuko et al. 2003), e a liberação de poliaminas evocada pela despolarização da membrana já foi descrita (Masuko et al. 2003). Foi proposto que as poliaminas extracelulares têm papel importante no desenvolvimento do SNC porque a quantidade de poliaminas é maior no período embrionário e neonatal do que na fase adulta. Além disso, é nessa fase que ocorre quantitativamente a maior expressão das subunidades NR2B (Williams 2009).

3.2.4 O canal iônico do NMDAr

O canal iônico do NMDAr possui alta permeabilidade aos íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}). No potencial de repouso o canal está bloqueado por íons Mg^{2+} (Riedel et al. 2003), impedindo a passagem de outros íons.

Para que o Mg^{2+} desobstrua o poro e ocorra a ativação do receptor NMDA, é necessário que haja uma despolarização da membrana neuronal. Esta despolarização ocorre com a ativação dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo AMPA. Por este motivo, a entrada de íons através do canal NMDA é considerada dependente de voltagem (Bear 2006). A despolarização proporciona a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, incluindo o glutamato, e a ativação do receptor NMDA, que resulta no influxo de íons, principalmente Ca^{2+} , e no efluxo de íons K^+ (Ozawa et al. 1998).

3.2.5 O domínio carbóxi-terminal do NMDAr

O domínio carbóxi-terminal da subunidade NR2 se liga a um grupo de proteínas homólogas às guanilato quinases associadas a membrana (MAGUK) que incluem PSD-95, proteína associada a sinapse (SAP-102) e PSD-93. A deleção da cauda do C-terminal interrompe a localização, a atividade sináptica e altera a plasticidade sináptica do NMDAr (Chung et al. 2004; Waxman and Lynch 2005). Essas proteínas possuem vários domínios de interação com o domínio PDZ (domínios de proteínas estruturais que servem para ancorar as proteínas transmembrana ao citoesqueleto), pela qual outras proteínas estão conectadas. Esta estrutura altamente organizada facilita a sinalização entre a superfície celular e citoplasmática. Através desse mecanismo as moléculas de sinalização dependentes de Ca^{2+} são trazidas para a proximidade do sítio de entrada do Ca^{2+} no NMDAr. Por exemplo, a nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), quando interage com o PSD-95, é trazida para próximo do NMDAr, a qual é eficientemente ativada pelo influxo de Ca^{2+} mediado por esse mesmo receptor (Aarts et al. 2002).

As ações do NMDAr podem ser mediadas pelo influxo de cálcio que é responsável pela ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio (PKC) e de proteínas quinases dependentes de cálcio-calmodulina II (CAMKII). Estas são responsáveis por algumas respostas celulares mediadas pelo NMDAr, incluindo a fosforilação do receptor e a plasticidade sináptica (Bliss and Collingridge 1993;

Elgersma and Silva 1999; Teyler 1999). Muitas dessas enzimas têm papel crítico na transdução de sinal e estão ligadas à subunidade NR2B diretamente, ou via proteínas do citoesqueleto (Loftis and Janowsky 2003).

3.2.6 NMDAr e epilepsia

O papel do receptor NMDA nas doenças neurodegenerativas tem sido um alvo de especial investigação (Gogas 2006; Moulton 2009). A excitotoxicidade mediada pela liberação excessiva de glutamato leva a ativação exagerada dos NMDAr, conseqüentemente acumula Ca^{2+} intracelular e eventualmente leva a morte neuronal, o que parece ser um mecanismo comum de morte celular a diversas patologias agudas e crônicas. Esse processo ocorre durante lesões isquêmicas, como o TCE ou AVE (Bullock et al. 1995) e em outras doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (Parsons et al. 1998). A atividade exagerada dos NMDAr também é observada na epilepsia (Löscher 1998) e dor neuropática (Palmer 2001).

Estudos sugerem que, NMDAr extra-sinápticos são enriquecidos de subunidades NR2B e os NMDAr sinápticos expressam a subunidade NR2A (Tovar and Westbrook 1999). Estes NMDAr extra-sinápticos podem ser ativados pela liberação excessiva de glutamato das sinapses vizinhas de neurônios lesados (Hardingham 2009). A ativação de neurônios que expressam a unidade NR2B provavelmente promove a neurotoxicidade e morte celular, e seu bloqueio tem efeito inverso, promovendo a proteção neuronal (Hardingham and Bading 2003; Liu et al. 2007; Martel et al. 2009; Zhou and Baudry 2006).

Estudos prévios consistentemente comprovaram a conexão entre a neurotransmissão glutamatérgica e certos tipos de atividade convulsiva. Entretanto, o grau e a natureza do envolvimento do NMDAr e suas subunidades ainda não estão totalmente compreendidos.

O abrasamento tem sido utilizado como modelo animal de epileptogênese, e consiste em aplicar estímulos elétricos ou químicos repetidos, inicialmente subconvulsivantes, que eventualmente resultam no desenvolvimento de convulsões límbicas e clônicas. Levando em consideração os resultados de Kraus and McNamara (1998; Kraus et al. 1994), o abrasamento não causa alteração nas expressões das subunidades conhecidas do NMDAr. Em contraste, (Mathern et al. 1998), utilizou

tecido humano, retirado de autópsia de pacientes com epilepsia do lobo temporal e comparou com o de pacientes não epiléticos. Foi concluído que houve um aumento na regulação da expressão das subunidades NR2A/B em todas as áreas do hipocampo que podem contribuir com a geração e propagação da atividade convulsiva.

A fim de elucidar a relação entre NMDAr e atividade convulsivante, (Kojima et al. 1998) utilizou camundongos transgênicos que expressavam uma forma constitutivamente ativada da Fyn (uma enzima da família das tirosina quinases) ou uma forma nativa da Fyn. Foi sugerido que os camundongos que expressavam a forma ativada da Fyn eram mais suscetíveis a estímulos convulsivantes. Encontraram também que a fosforilação da subunidade NR2B estava aumentada tanto em camundongos nativos quanto em transgênicos. Conseqüentemente a fosforilação da subunidade NR2B pela Fyn está envolvida na suscetibilidade a convulsão mediada pelo NMDAr.

Utilizando dados de modelos animais e de pacientes com epilepsia, descobriu-se que tanto a diminuição da inibição GABAérgica, quanto o aumento da excitação glutamatérgica estão criticamente envolvidas nos processos celulares envolvidos na iniciação e propagação das crises convulsivas (Dichter 1989).

3.2.7 Antagonistas NMDAr e seu efeito anticonvulsivante

Vários estudos têm mostrado que antagonistas do receptor NMDA são anticonvulsivantes em modelos animais de convulsão aguda e crônica (Czuczwar and Meldrum 1982; De Sarro and De Sarro 1993; McNamara et al. 1988). É consenso que os antagonistas NMDA (competitivos e não-competitivos) têm papel anticonvulsivante, pois diminuem os potenciais de ação excitatórios causados pela atividade elétrica anormal do foco epilético. Porém, sua função mais promissora está na ação antiepileptogênica, a qual ainda não se tem ação comprovada em humanos (Loscher et al. 1988; McNamara et al. 1988). Isto significa que: eles são mais efetivos em inibir o abrasamento, porém menos efetivos em inibir as convulsões depois que ocorrer abrasamento.

A maioria dos bloqueadores do canal iônico do NMDAr desenvolvidos nos anos de 1980-1990, como MK-801, falhou como anticonvulsivante quando testada em humanos. Essa classe de drogas foi proscrita para o uso clínico em pacientes portadores de epilepsia devido aos efeitos colaterais limitantes, como alucinações, amnésia e

incoordenação motora (Löscher 1998; Sveinbjornsdottir et al. 1993). Entretanto, com a descoberta de novos antagonistas seletivos a subunidade NR2B renovou-se o interesse por essa classe de drogas.

O felbamato, um anticonvulsivante de segunda geração, em doses clinicamente relevantes, dentre outras ações, inibe as respostas evocadas por NMDA. Este anticonvulsivante antagoniza com maior afinidade a subunidade NR2B do que qualquer outra subunidade do receptor NMDA (Harty and Rogawski 2000; Kleckner et al. 1999). Esta seletividade poderia, em parte, explicar a baixa toxicidade neurocomportamental do felbamato quando comparado a outros antagonistas NMDA. Levando em conta as alterações de expressão têmporo-espacial das subunidades NR2B, que se expressam abundantemente em encéfalos em desenvolvimento, agentes que atuam nessa subunidade, como o felbamato, teriam importante utilidade clínica nas doenças convulsivas da infância, como a síndrome de Lennox-Gastaut (Rogawski and Loscher 2004).

Estudos nos anos 80 e 90 demonstraram que o ifenprodil (mostrado na Figura 7), uma feniletanolamina, originalmente desenvolvida para ser um antagonista $\alpha 1$ adrenérgica (Adeagbo 1984) era também antagonista NMDA com mecanismo de ação diferente dos antagonistas utilizados até então (Carter et al. 1988). (Williams 1993) descobriu que o ifenprodil apresentava seletividade (>100 vezes) para a subunidade NR2B, por isso foi considerado um antagonista atípico, por ser não competitivo e seletivo para a subunidade NR2B, além de que não agia como os bloqueadores de canais (MK-801 e fenciclidina). O Ifenprodil, por sua vez termina o estado epiléptico prolongado induzido por estimulação contínua do hipocampo (Yen et al. 2004) e reduz a aquisição de abrasamento elétrico na amídala (Yourick et al. 1999). Além disso, o ifenprodil reduz as convulsões induzidas por bicuculina em culturas de hipocampo (Wang and Bausch 2004), apoiando ainda mais seu papel como anticonvulsivante.

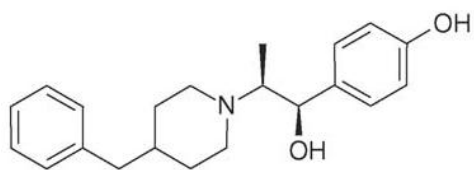
Mais tarde, outros compostos foram desenhados baseado na estrutura química do ifenprodil, e classificados como a segunda geração dos antagonistas da subunidade NR2B do receptor NMDA. Dentre tais compostos inclui-se o CP-101,606, que presume-se compartilhar o mesmo sítio de ligação do ifenprodil na subunidade NR2B (Williams 2009). O CP-101,606, que foi desenvolvido pela Pfizer (Nova Iorque, NY, EUA), é também conhecido como traxoprodil, conforme mostrado na Figura 7. Estes compostos são cerca de 10 vezes mais seletivo a subunidade NR2B, não têm efeito

sobre os canais de Ca^{2+} de alta voltagem (Bath et al. 1996), receptor σ (Contreras et al. 1990) nos α_1 -adrenoceptor (Chenard et al. 1995), tornando-o uma importante ferramenta para o estudo farmacológico desta subunidade (Gogas 2006; Menniti et al. 1997; Mony et al. 2009a).

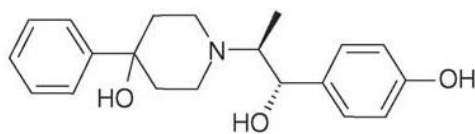
O traxoprodil foi testado em ensaios clínicos de traumatismo crânio-encefálico (Yurkewicz et al. 2005), depressão refratária (Preskorn et al. 2008) e doença de Parkinson (Nutt et al. 2008). Na literatura foi demonstrado que, o uso do traxoprodil não causa os efeitos colaterais típicos dos antagonistas NMDA não seletivos, quando usado em doses terapêuticas (Chizh and Headley 2005; Kemp and McKernan 2002). Uma explicação para isso é que o traxoprodil não tem ação sobre os NMDARs do cerebelo que não expressam a subunidade NR2B, uma área importante para coordenação motora; outro motivo pode ser explicado por ter seu efeito máximo sobre os NMDAR persistentemente ativados que se encontra em pH ácido, como o ocorre durante a excitotoxicidade (Williams 2009), poupando os NMDAR com função fisiológica.

(Menniti et al. 2000) demonstrou que o traxoprodil inibe a iniciação e propagação de depressão alastrante induzida eletricamente, significando que ele possa ter efeito anticonvulsivante em outros modelos animais. Entretanto, até o momento não foram feitos outros estudos para elucidar seu espectro anticonvulsivante em modelos animais.

É importante levar em consideração os efeitos deletérios dos anticonvulsivantes sobre a cognição de seus usuários (Meador 2008; Meador et al. 2007). Interessantemente o traxoprodil apresenta resultados conflitantes sobre a memória, que incluem: melhora (Higgins et al. 2005), leve piora (Walker and Davis 2008) e ausência de efeito sobre a memória (Guscott et al. 2003). Entretanto, o efeito deletério do traxoprodil sobre a cognição é bifásico e dose dependente, (Gomes et al. 2010) sugere que o traxoprodil, em altas doses não tem efeito sobre a memória.



Ifenprodil



Traxoprodil

Figura 7- Estrutura química do Ifenprodil e do Traxoprodil. Fonte: modificado de Gogas 2006.

3.3 EPILEPSIA

A epilepsia é uma das doenças mais comuns da neurologia (Lowenstein 2008). De acordo com a OMS, até 10% das pessoas podem apresentar pelo menos um episódio de crise convulsiva durante a vida, e pelo menos um terço delas terão recorrência dos sintomas e desenvolverão epilepsia, que é uma doença caracterizada pela ocorrência de crises convulsivas espontâneas. No mundo, a epilepsia afeta 50 milhões de pessoas (Lowenstein 2008).

Epilepsia não é uma única doença específica, ou mesmo uma síndrome singular. Pelo contrário, ela compreende uma ampla categoria de sinais e sintomas que florescem de funções encefálicas desordenadas, que por sua vez podem ser secundárias a uma variedade de processos patológicos. Os termos crise convulsiva e convulsão são muitas vezes erroneamente considerados sinônimos de epilepsia. Eles se referem a episódios paroxísticos recorrentes de disfunções do córtex cerebral que se manifestam como alterações do comportamento estereotipadas. De acordo com o grupo neuronal que dispara, as manifestações podem ser variadas, desde abalos motores dramáticos até fenômenos de experiências pouco discerníveis pelo observador (Berg et al. 2010).

As convulsões resultam de um desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória do SNC, e podem ser resultado da alteração da expressão de vários canais iônicos, receptores excitatórios, inibitórios ou seus sítios modulatórios

(Cremer et al. 2009). Tendo em vista as numerosas propriedades que controlam a excitabilidade neuronal, não é surpresa o fato de existirem variadas formas de perturbar esse equilíbrio e, portanto, muitas afecções podem causar convulsões ou levar à epilepsia.

Existe uma fase de início e uma fase de propagação da convulsão. A fase de iniciação caracteriza-se por dois eventos concomitantes, em um grupo de neurônios: (1) salvas de potenciais de ação e (2) hypersincronização. A despolarização da membrana leva à atividade paroxística, causada pelo influxo de Ca^{2+} extracelular, o que leva à abertura de canais de Na^+ voltagem dependente, gerando potenciais de ação excitatórios de alta frequência. Tal evento é seguido de um pós-potencial hiperpolarizante inibitório mediado por receptores do ácido- γ -aminobutírico (GABA) ou canais de K^+ , de acordo com o tipo celular. Essas salvas sincronizadas resultam nas chamadas descargas em ponta visíveis no EEG (Lowenstein 2008). Para que ocorra o impedimento da propagação de despolarizações paroxísticas, há mecanismos de proteção que se constituem de neurônios inibitórios circundantes que levam a hiperpolarização da membrana celular. Caso os estímulos excitatórios ultrapassem a capacidade dos neurônios dessa região em contê-los, haverá recrutamento de novos neurônios circundantes por diversos mecanismos. (1) aumento de K^+ extracelular, que dificulta a hiperpolarização e despolariza os neurônios vizinhos; (2) acúmulo de Ca^{2+} nas terminações pré-sinápticas, com maior liberação de neurotransmissores; e (3) ativação dos receptores NMDA, que levam ao influxo de Ca^{2+} e Na^+ (Lowenstein 2008).

Essas alterações podem ser herdadas geneticamente ou adquiridas. Por exemplo, as mutações dos genes de canais sódio (SCN 1 e 2), que levam à despolarização da membrana, deixando-a hiperexcitável, causando convulsões febris na infância e outras formas de convulsão na vida adulta (Berg et al. 2010). Outro exemplo de epilepsia adquirida é o trauma crânio encefálico grave penetrante que corresponde a um risco de 50% para o paciente desenvolver epilepsia subsequente (Lowenstein 2001). O processo que resulta em uma modificação anatomopatológica persistente no SNC, que transforma uma rede neuronal normal em uma rede anormalmente hiperexcitável se chama epileptogênese. Muitas vezes há um atraso de meses a anos entre a lesão inicial do SNC e a primeira convulsão. É proposto que os NMDAr estão envolvidos na epileptogênese, por esse motivo tornou-se um importante foco de pesquisa da epilepsia, tanto em modelos animais quanto na clínica (Hernandez 1997; Loscher 2002; Lowenstein 2001).

Neste contexto, foi mostrado que a espermina (Kirby and Shaw 2005) e espermidina (Shimosato et al. 1997) apresentam um efeito pró-convulsivante, e que a arcaína, uma antagonista do sítio de ligação das poliaminas, tem ação anticonvulsivante (Doyle and Shaw 1996). Em concordância com esses achados, a superexpressão da enzima de degradação das poliaminas, a espermidina/espermina N-1-acetiltransferase, eleva o limiar de convulsão induzida pelo PTZ em camundongos (Kaasinen et al. 2003), sugerindo que diminuir os níveis de poliaminas, significa melhor controle das convulsões. Evidências de estudos clínicos também apoiam esses achados, já que, foram encontrados altas concentrações de espermidina em focos epileptogênicos do hipocampo de pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal (Laschet et al. 1992; Laschet et al. 1999). Compreender as interações entre as poliaminas, o receptor NMDA, a subunidade NR2B e os antagonistas NMDAr/NR2B, pode levar a um melhor entendimento de sua ação na epilepsia.

Recentemente, houve grande avanço no diagnóstico e tratamento das convulsões. Entretanto, os mecanismos moleculares do desenvolvimento da epilepsia, ainda estão incompletos. Apesar desse progresso no tratamento, em torno de 30% dos casos são resistentes aos fármacos existentes no mercado (Loscher 2002; Lowenstein 2008). Isto quer dizer que, ou a droga não controla as convulsões por completo, ou a controla, porém em doses que levam a efeitos colaterais limitantes. Até o momento, para os pacientes em que a farmacoterapia eficientemente controla as convulsões, ainda não existe agente anticonvulsivante que afete a progressão da história natural da epilepsia: a epileptogênese (Loscher 2002; Temkin 2001). Desta forma, o tratamento baseia-se somente no controle das crises convulsivas.

3.4 DROGAS ANTICONVULSIVANTES

É interessante classificar os anticonvulsivantes de acordo com seus mecanismos de ação básicos. Para conter a despolarização paroxística de um neurônio deve-se modular a excitação e a inibição da membrana celular. Para isso, os anticonvulsivantes basicamente atuam de três formas: agem sobre os canais iônicos voltagem-dependentes, sobre receptores glutamatérgicos e GABAérgicos (Rogawski and Loscher 2004). Entretanto, a totalidade dos mecanismos celulares dos anticonvulsivantes ainda não é conhecida. Os antagonistas dos canais iônicos NMDAr e não-NMDAr agem diminuindo

o influxo de cátions para dentro da célula, logo diminuem o potencial excitatório da membrana. Os agonistas GABAérgicos aumentam o influxo de Cl^- transmembrana, logo causam hiperpolarização (potencial inibitório). Os canais iônicos voltagem-dependentes são importantes para manter o equilíbrio iônico da membrana. A maioria dos anticonvulsivantes têm efeito sobre os canais de Na^+ voltagem-dependentes, porém não são de menos importância os fármacos que agem sobre os canais de K^+ e Ca^{2+} , pois todos eles modulam a liberação e responsividade aos neurotransmissores, que desencadeiam os potenciais de ação. (Rogawski and Loscher 2004).

O tratamento das convulsões é um campo de constante descobertas. Com a exceção dos brometos e do fenobarbital, as drogas anticonvulsivantes foram primeiro testadas em modelos animais, o que tornou seu desenvolvimento e evolução especialmente rápidos. Encontramos hoje no mercado mundial mais de duas dúzias de drogas para o tratamento da epilepsia e de crises convulsivas agudas. Elas são: acetazolamida, carbamazepina, clonazepan, clorazepato, etosuximida, etotoína, felbamato, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, mefenitoína, metsuximida, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, fosfenitoína, primidona, tiagabina, topiramato, trimetadiona, valproato, vigabatrina, zonisamida, diazepam, lorazepam, midazolam, propofol (Rogawski and Loscher 2004).

Apesar das descobertas dos últimos 18 anos de 13 novas drogas antiepilépticas, aproximadamente 30% dos pacientes não atingem um controle satisfatório das convulsões (Pollard and French 2006). Por essa razão ainda deve-se investigar novos agentes. Ultimamente mais de trinta novas drogas estão sendo testadas em vários estágios clínicos (para revisão ver Perucca et al. 2007; Pollard and French 2006). Encontram-se nesse grupo drogas análogas aos antigos anticonvulsivantes, com ação voltada para os mesmos mecanismos, porém, com estruturas modernizadas desenvolvidas para terem melhor segurança e eficácia. Por outro lado, novos compostos estão sendo testados, sem semelhança com anticonvulsivantes antigos. Estes compostos são frutos de extenso rastreamento em modelos animais de epilepsia. Muitos são anticonvulsivantes por novos mecanismos de ação e alguns, entretanto, ainda não têm seu mecanismo elucidado (Perucca et al. 2007).

Com isto, procuramos através deste trabalho avaliar o efeito anticonvulsivante do traxoprodil sobre as convulsões induzidas por PTZ.

4. CAPÍTULO

O resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito (seção 4.1), que foi submetido para publicação na revista Epilepsia. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no mesmo.

4.1 MANUSCRITO

“Traxoprodil atenua as convulsões induzidas por pentilenotetrazol”

TRAXOPRODIL DECREASES PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED SEIZURES

Ana Paula Naspolini¹, Ariane Rubin Cocco¹, Felipe Villa Martignoni^{1,2},
Mauro Schneider Oliveira^{2,4}, Ana Flávia Furian^{2,4},
Leonardo Magno Rambo¹, Maribel Antonello Rubin^{2,3}, Susan Barron⁵,
Carlos Fernando Mello^{1,2*}

¹Department of Physiology and Pharmacology

²Graduate Program in Pharmacology

Center of Health Sciences

³Department of Chemistry

Center of Exact and Natural Sciences

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

⁴Department of Agroalimentary Science and Technology

Campus Itaqui

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Itaqui, RS 97650-000, Brazil

⁵Department of Psychology

University of Kentucky
Lexington, KY 40506, USA

* Corresponding author: Dr. Carlos Fernando Mello

Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL.

FAX: +55 55 3220 8241

e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br, mello.cf@gmail.com

Running title: Traxoprodil decreases seizures

Number of words: 4964

Number of pages: 18

Number of figures: 3

Number of Tables: 2

Abstract

Polyamines including spermine and spermidine facilitate seizures by positively modulating N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr). Selective antagonists at the NR2B-subunit of the NMDAr appear to decrease seizures. However, it remains undetermined whether traxoprodil (CP-101,606), an ifenprodil analog that acts as a selective antagonist at the NR2B subunit of the NMDAr, decreases seizure activity. In the current study we investigated whether CP 101-606 (traxoprodil), a selective antagonist at the NR2B subunit of the NMDAr, alters pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures in adult male Wistar rats as measured by both behavioral and electrophysiological endpoints. Spermidine (SPD) (2 nmol/site; i.c.v.) facilitated behavioral and electroencephalographic seizures induced by a normally sub-threshold dose of PTZ (35 mg/kg; i.p.), but did not alter seizure activity induced by a convulsant dose of PTZ (70 mg/kg; i.p.). Traxoprodil (20 nmol i.c.v.) increased the latency to generalized tonic-clonic seizures induced by PTZ (70 mg/kg; i.p.). The oral administration of traxoprodil (60 mg/kg) increased the latency to clonic and tonic-clonic seizures, and decreased the total time spent in seizures. These results support the role of the NR2B subunit in PTZ-induced seizures. While more studies are necessary to determine whether CP 101,606 is a useful anticonvulsant in clinical settings, drugs that modulate or block NR2B subunits may represent new targets for medication development for convulsive disorders.

Keywords: traxoprodil; CP-101,606; polyamines; spermidine; seizures; pentylenetetrazole.

Introduction

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS), and plays an important role in both synaptic transmission and neural plasticity through the activation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors (Watkins & Jane 2006). However, glutamate receptors, particularly of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype, have also been implicated in the pathogenesis of several CNS disorders, including stroke (Mellergard et al. 1989), neurodegenerative diseases (Greenamyre et al. 1988, Greenamyre et al. 1985), epilepsy and isolated seizure events (Kohr & Heinemann 1989, Waxman & Geschwind 2005).

NMDAR are heteromeric complexes composed of four subunits derived from three related families: NR1, NR2, and NR3, which are encoded by at least seven known subunit genes (Monaghan & Jane 2008). One of these genes codes for the NR1 subunit, a ubiquitous component of NMDA receptor channels whose diversity is created by alternative splicing of the NMDAR1 subunit gene to yield eight splice forms. The heterogeneity of the NR2 and NR3 subunits occur due to the existence of multiple, related genes, NMDAR2A–2D, and NMDAR3A–3B, respectively (Loftis & Janowsky 2003). Functional glutamate- and glycine-responsive NMDA receptors are thought to require both NR1 and NR2 subunits (Monaghan & Jane 2008), and arrange and operate as dimer of dimers (Furukawa et al. 2005). The NR1 and NR2 subunit composition determines NMDAR sensitivity to a number of endogenous and exogenous modulators, including protons, zinc (Elsas et al. 2009, Low et al. 2000), neurosteroids (Mony et al. 2009), polyamines (Williams 1997), ifenprodil and related compounds, such as traxoprodil (Cull-Candy & Leszkiewicz 2004). While NR2 subunit expression varies with developmental stage and anatomical location (Charton et al. 1999, Niemann et al. 2007), accumulating evidence supports that the NR2B subunit is necessary for polyamine-induced voltage-independent and glycine-independent potentiation of NMDAR, as well as its inhibition by

ifenprodil (Hatton & Paoletti 2005, Williams 1993). Consequently, polyamines, ifenprodil and traxoprodil have been used to characterize the involvement of NMDA receptor, particularly of the NR2B subunit, in a number of physiological (Tang et al. 1999), pathological (Di et al. 1997) and pharmacological effects (Chizh et al. 2001, Paoletti & Neyton 2007).

Epileptic seizures are associated with an imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmission, and may be the result of changes in the expression of not only one but various excitatory, inhibitory and/or modulatory neurotransmitter receptors (Cremer et al. 2009). A proconvulsant effect has been reported for the polyamines spermine (Kirby & Shaw 2005) and spermidine (Shimosato et al. 1997), as well as an anticonvulsant effect for the putative antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, arcaine (Doyle & Shaw 1998). Overexpression of a polyamine degradation enzyme elevates PTZ-induced seizure threshold in mice (Kaasinen et al. 2003), providing further support that diminishing polyamine levels may decrease seizures. Circumstantial evidence from experimental and clinical studies further support this view, since spermidine levels are increased in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy (Laschet et al. 1999) and polyamine metabolism is increased in kindled rats (Hayashi et al. 1992, Hayashi et al. 1993).

While antagonists of the NMDAr have been shown to reduce seizures (Bausch et al. 2010, Rogawski 1992), their psychotomimetic and deleterious effects on motor function and memory limit the usefulness of this class of drugs as anticonvulsants (Loscher & Schmidt 1994, Sveinbjornsdottir et al. 1993), except for felbamate (Wasterlain & Chen 2008). Interestingly, felbamate presents a relative preference for NR2B-containing NMDAr (Harty & Rogawski 2000), is also a low efficacy positive allosteric modulator of GABA_A receptors (Rho et al. 1994) and a state-dependent antagonist of voltage-sensitive Na⁺ channels (Pisani et al. 1995). In fact, it has been suggested that NR2B-selective antagonists may have advantageous

anticonvulsant activity, and a reduced tendency to cause neurobehavioral side effects (Chizh et al. 2001).

Traxoprodil, is an antagonist at the ifenprodil site with high affinity for NMDAR containing the NR2B subunit (Merchant et al. 1999, Yen et al. 2004), that has been shown to be neuroprotective in animal models of brain injury and ischemia (Di et al. 1997, Menniti et al. 1997, 2000, Okiyama et al. 1997, Yurkewicz et al. 2005). Moreover, studies in rats have shown that traxoprodil improves performance in cognitive tests (Okiyama et al. 1997) and has a potent analgesic activity at doses devoid of psychotomimetic side effects (Boyce et al. 1999). The current study was designed to investigate whether traxoprodil decreases behavioral and electroencephalographic seizures induced by PTZ, a widely accepted animal model of seizures with potential clinical utility (White et al. 2006).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) maintained under controlled light and environmental conditions (12-h light/dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. The procedures reported in this study were conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 0206). All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimize their suffering.

Drugs

PTZ was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Traxoprodil was generously donated by Pfizer Inc. (New York, NY, USA). Reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

Surgical procedures

All animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg)/xylazine (8 mg/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two cannula were inserted bilaterally into the lateral ventricles (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 1.5 mm, V 2.5 mm from the dura) (Paxinos and Watson, 1986). For electroencephalogram (EEG) recordings, two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. After surgery, all rats received a single s.c. injection of 0.01 mg/kg buprenorphine hydrochloride for amelioration of pain. The experiments were performed 7–9 days after surgery.

Drug administration protocol

The effect of traxoprodil and spermidine on PTZ-induced seizures was investigated by injecting the animals with traxoprodil (0.2, 2 or 20 nmol/site), spermidine (0.02, 0.2 or 2 nmol/site), or with vehicle (0.85% NaCl, 2 μ l) 15 min before the administration of PTZ (35 or 70 mg/kg, i.p.). All i.c.v. injections were performed by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below a guide cannula. All drugs were injected over 1-min period by using a 10 μ l Hamilton

syringe, and an additional min was allowed to elapse before removal of the needle to avoid backflow of drug through the cannula. Doses and time elapsed between drug injection and PTZ injection were selected based on previous studies (Oliveira et al. 2009). After each experiment, the animals were injected with a dye (5 μ l of methylene blue), deeply anesthetized with thiopental and killed 15 min thereafter. The positioning of the cannula was considered correct if the ventricular system was pigmented at the stereoscopic analysis of coronal cerebral slices. Only data from those animals that had a correct cannula positioning were analyzed, and animals with incorrect cannula placement accounted for less than 5% of the animals.

In those experiments designed to investigate whether systemic traxoprodil had anticonvulsant activity, the animals were administered traxoprodil (60 mg/kg) by gavage and 60 min later they were injected with PTZ (70 mg/kg, i.p.). Emerging seizures were monitored by electrocorticographic recording and behavioral observation, as described below.

Seizure evaluation

At the day of the experiments, each animal was transferred to a Plexiglas cage (25 x 25 x 40 cm) and habituated for 20 min before EEG recording. The rat was then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage, and the EEG was recorded using a digital encephalograph (Neuromap EQSA260, Neurotec Ltd, Itajubá, MG, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass), digitized (sampling rate 256 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. Routinely, a 10 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After baseline recording, drugs were administered according to the drug administration protocol above, and the animals were observed for the appearance of clonic and generalized tonic–clonic convulsive episodes for 20 min according to Ferraro et al. (1999), who describes clonic convulsions as episodes characterized by typical partial clonic

activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Generalized convulsive episodes were considered as generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. PTZ-induced generalized seizures typically lasted between 30 and 60 s, and were followed by a quiescent period. During the 20-min observation period, the latencies for the first clonic and first generalized tonic-clonic seizures were measured. EEG recordings were visually analyzed for seizure activity, which were defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads (McColl et al. 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes ($\geq 1 \text{ s} \leq 5 \text{ s}$); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in long spindle episodes ($\geq 5 \text{ s}$); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, $\geq 5 \text{ s}$). Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded.

Statistical analysis

Latency to clonic and tonic-clonic seizures were analyzed by Kruskal-Wallis (nonparametric ANOVA) or a Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). *Post hoc* analyses were carried out by the Dunn's multiple comparison test. Data are presented as median and interquartile ranges. The total time spent in partial and tonic-clonic generalized seizures were analyzed by parametric one- or two-way ANOVA and data are presented as means and standard error of the mean (S.E.M.). A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and P and H values are shown only if $P < 0.05$.

Results:

The administration of spermidine (0.2 - 2 nmol, i.c.v.) did not alter the latency to seizures induced by a fully effective convulsant dose of PTZ (70 mg/kg, data not shown). On the other hand, SPD (2 nmol/site; i.c.v.) facilitated seizures when injected with a subeffective dose of PTZ (35 mg/kg), measured as the latency to clonic [$H(1)=11.175$; $P<0.05$, Table 1] or generalized tonic-clonic [$H(1)=6.791$; $P<0.05$, Table 1] seizures. While the injection of PTZ alone did not cause major seizure activity, the combined administration of spermidine and PTZ caused the appearance of multispikes plus slow waves in the EEG, which correlated with characteristic myoclonic jerks. Generalized seizures were characterized by the appearance of 2–3 Hz high-amplitude activity in all recording leads and tonic-clonic convulsions (Fig. 1A–F).

Figure 2 shows the effect of traxoprodil (0.2 - 20 nmol, i.c.v.) on the latency to clonic (A) and tonic-clonic (B) seizures induced PTZ (70 mg/kg). The administration of the selective NR2B antagonist, traxoprodil (20 nmol/site, i.c.v.) increased the latency to PTZ-induced generalized seizures [$H(3)=11.01$; $P<0.05$], but had no effect on the latency to clonic seizures. The representative EEGs (Fig. 2C–F) show that traxoprodil delayed seizures, but did not alter clonic and generalized seizure-associated wave patterns in the EEG recordings, which appeared as multispikes plus slow waves and multiple sharp waves (Fig. 2C–F), respectively.

We also tested whether SPD (2 nmol/site, i.c.v.) prevented the anticonvulsant effect of traxoprodil. However, statistical analysis of latencies to clonic and generalized seizures revealed only a significant effect of NR2B antagonist administration [$H(1)= 6.10$; $P<0.05$ and $H(1)= 8.03$; $P<0.05$, respectively, data not shown]. The electrographic pattern of the seizures

presented by animals injected with traxoprodil+spermidine in this experiment was similar to that presented by animals treated with traxoprodil+vehicle (data not shown).

Since intracerebroventricular administration of traxoprodil decreased PTZ-induced seizures, the effect of orally-administered traxoprodil on PTZ-induced seizures was investigated (Table 2). Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) revealed that traxoprodil (60 mg/kg p.o.) increased the latency to clonic [$H(1)=4.82$; $P<0.05$ Fig. 3A] and generalized tonic-clonic [$H(1)= 4.82$; $P<0.05$ Fig. 3B] seizures. In addition, orally-administered traxoprodil decreased total time spent in generalized seizures [$F(1,7)=37.5$; $p<0.001$, Table 2]. Representative EEGs depicted in Fig. 3A–F show that traxoprodil delays PTZ-induced seizures. These results support an anticonvulsant role for traxoprodil. It is worth pointing out that traxoprodil administration, either by intracerebroventricular (0.2-20 nmol/site) or oral (60 mg/kg) routes did not cause apparent sedation, ataxia or other visible CNS side effect (data not shown).

Discussion:

In this study we showed that the intracerebroventricular administration of traxoprodil increases the latency to PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures. The oral administration of traxoprodil (60 mg/kg) not only increased the latency to PTZ-induced clonic and tonic-clonic generalized seizures, but also decreased total time spent in generalized seizures, further supporting an anticonvulsant role for this NR2B antagonist. Moreover, the concomitant administration of the NR2B agonist spermidine (2 nmol/site, i.c.v.) with a normally subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg) induced the appearance of clonic and tonic-clonic seizures.

Polyamines are positively charged amines found in the CNS in submillimolar concentrations both extra and intracellularly (Turecek et al. 2004), whose physiologic role is not clear (Williams 2009), although at least one well-defined extracellular binding site for polyamines has been described in the N-terminal domain of the NR2B subunit of the NMDAR (Gallagher et al. 1997). In addition, it has been shown that spermidine is taken up via a high affinity Na^+ - and energy-dependent mechanism in brain preparations (Harman & Shaw 1981a), and released by K^+ - and ouabain-induced depolarization (Fage et al. 1992, Harman & Shaw 1981b). Interestingly, NMDAR stimulation produces a massive release of spermidine (Fage et al. 1992). Therefore, the identification of (i) an extracellular site of action with structural specificity for polyamines, (ii) polyamine extracellular release and (iii) a specific Na^+ -dependent uptake system for polyamines strongly suggests that these molecules exert extracellular physiological functions in the brain (Kauppinen & Alhonen 1995).

It has been long known that spermidine facilitates neuronal firing (Wedgwood & Wolstencroft 1977), and elicits epileptic electrocortical activity in rats (De Sarro 1986), mice and rabbits (Anderson et al. 1975). In addition, SPD enhances NMDLA-, cocaine- and lidocaine-induced seizures, suggesting that SPD facilitates seizures via NMDAR modulation (Shimosato et al. 1997). Furthermore, the overexpression of spermidine/spermine N-1-acetyltransferase, the enzyme responsible for polyamines degradation in mammalian CNS, elevates the threshold to pentylenetetrazol-induced seizure activity in transgenic mice (Kaasinen et al. 2003). These results are in agreement with the findings that n-1 dansylspermine, a potent polyamine antagonist, can control epileptiform activity in vitro and polyamine-induced seizures in vivo (Kirby & Shaw 2005). Interestingly, it has been suggested that increased polyamine content in human brain might contribute to the loss of excitability control in human temporal epilepsy (Laschet et al. 1999). Therefore, the currently reported decrease of PTZ-induced seizure threshold by spermidine is in agreement with the view that polyamines facilitate seizures, and

with the studies that have demonstrated that seizure threshold may be assessed by a protocol that uses a normally subconvulsant dose of PTZ (approximately 30 mg/kg) (Golarai et al. 2001, Kharatishvili et al. 2007). It is interesting, however, that SPD did not alter the seizures induced by a fully effective convulsant dose of PTZ (70 mg/kg). It is possible that a “ceiling effect” for PTZ-induced seizures, in terms of severity, has been achieved with the dose of 70 mg/kg. As a result, additional decreases in the latencies to clonic and generalized seizures would be difficult to achieve, and detect. In this respect, our results are also in agreement with the study that has shown that SPD does not facilitate PTZ-induced seizures (Shimosato et al. 1997).

In the current study we showed that intracerebroventricularly-administered traxoprodil decreases tonic-clonic, but not PTZ-induced clonic seizures. On the other hand, orally-administered traxoprodil decreased both clonic and tonic-clonic seizures. There are a number of obvious differences between the two routes of administration that may account for the differences in efficacy of traxoprodil, including (although not limited to) the total amount of drug that reaches the CNS, the homogeneity of drug distribution in the cerebral tissue and the concentration of the drug in specific cerebral nuclei. Regardless of the cause for this discrepancy, it is interesting that all NMDA receptor antagonists readily inhibit the tonic extension and mortality caused by PTZ (Palmer et al. 1999, Parsons et al. 1995), while a limited number prevent clonic convulsions, including MK801, D-CPP, ADCl, felbamate (Palmer et al. 1999, Rogawski 1991, Swinyard 1986), and traxoprodil, reported in this study.

Since both SPD and traxoprodil bind to the N-terminal subunit of the NR2B receptor (Gallagher et al. 1997), we investigated whether this polyamine prevented the anticonvulsant effect of icv-administered traxoprodil. However, traxoprodil decreased seizures regardless of the presence of SPD, as the statistical analysis revealed only a significant effect of the NR2B antagonist. This is in agreement with recent studies that have shown that polyamines and traxoprodil-related compounds bind to different domains on the NR2B subunit (Paoletti &

Neyton 2007). Therefore, considering that traxoprodil and SPD bind to different sites, it is not surprising that SPD, at doses that do not alter PTZ-induced seizures per se, does not prevent traxoprodil anticonvulsant activity.

In summary, we described the anticonvulsant action of traxoprodil against PTZ-induced seizures. Taking into account that traxoprodil has been considered to cause no (Guscott et al. 2003) or mild (Gomes et al. 2010) effects on the memory of rats, it is possible that traxoprodil, or a similar derivative, may be of value for developing other NMDAr antagonists with less side effects and potential clinical use. These data are particularly stimulating if one considers that a phase I clinical trial revealed minimal side effects in healthy volunteers treated with traxoprodil i.v. up to 3 mg/kg/h. However, prolonged treatment with 2.5 mg/kg/15 min followed by 0.3 mg/kg/h for 71.75 h caused facial numbness, nausea, headache, dizziness, spacey feelings, amnesia, anxiety and inflammation at the site of injection (Palmer 2001). Therefore, additional clinical studies are necessary to determine dose ranges and serum concentrations necessary to determine anticonvulsant activity for traxoprodil, and whether chronic oral doses are well tolerated by human beings.

Table 1.

Effect of spermidine (2 nmol/site; i.c.v.) and PTZ (35 mg/kg), on the latency to clonic and generalized tonic-clonic seizures.

Treatment	Vehicle (n=3)	Spermidine (2 nmol, n=6)
Latency to clonic seizure (s)	1200 (1200-1200)	92 (77-146)*
Latency to generalized seizure (s)	1200 (1200-1200)	135 (95-1200)*

* $P < 0.05$, compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis test). Data are median and interquartile ranges.

Figure 1

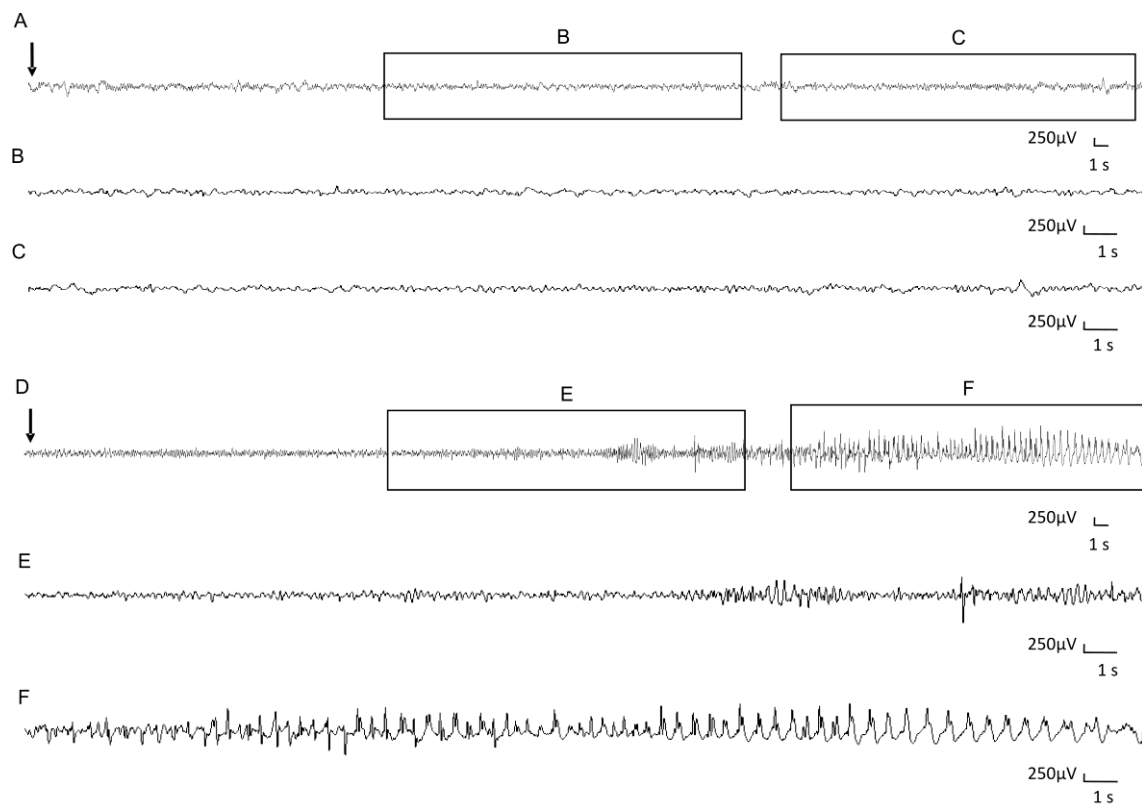


Figure 1. Representative EEG recordings of rats injected with vehicle (0.85% NaCl, 2 µl/site; i.c.v., A-C) or SPD group (2 nmol/site; i.c.v., D-F). In all traces the arrow indicates PTZ (35 mg/kg) administration. EEG traces delimited by boxes B, C, E and F are shown in detail in B, C, E and F recordings.

Figure 2

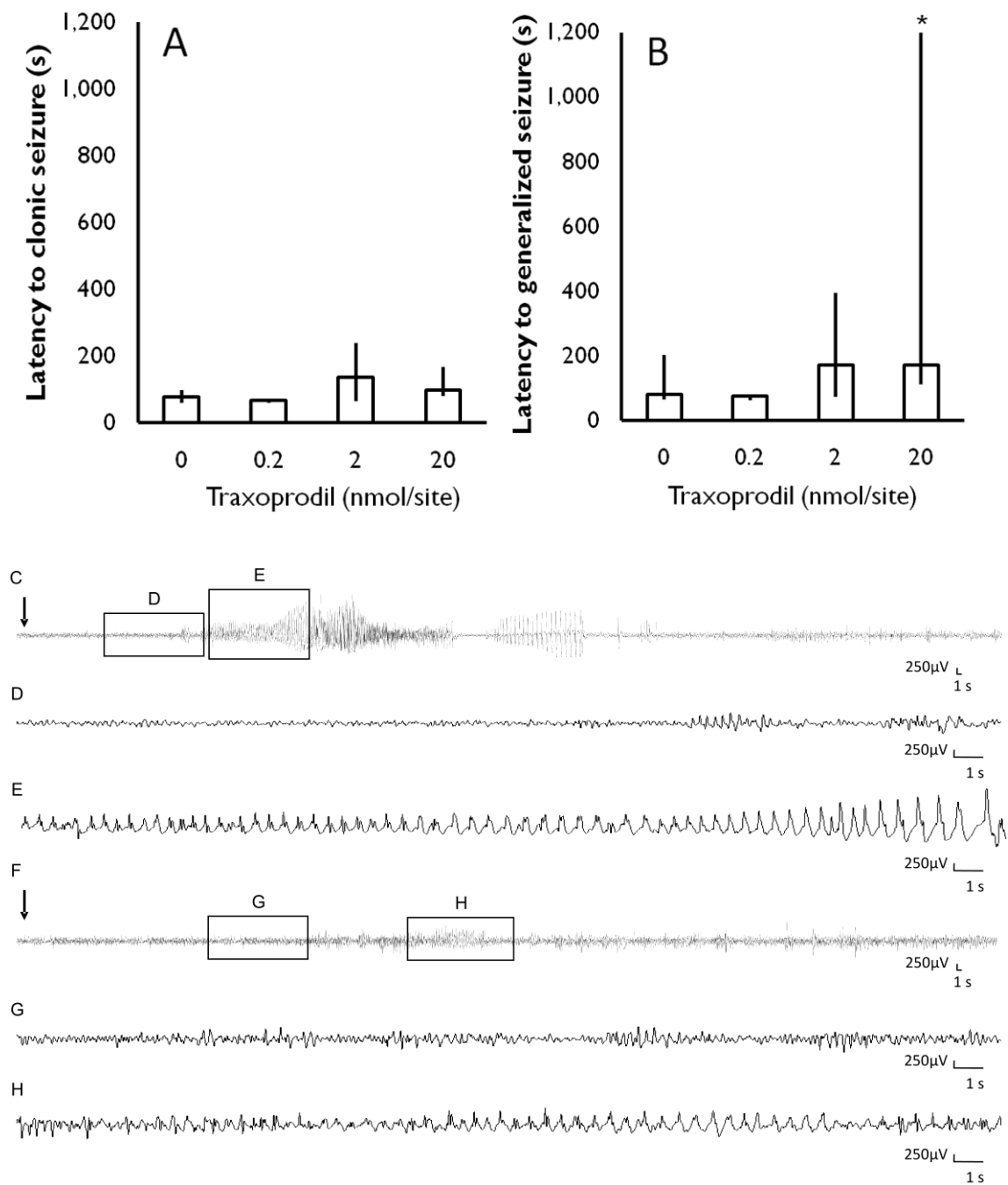


Figure 2. Traxoprodil (0.2, 2 or 20 nmol/site, i.c.v.) has no effect on the latency to clonic (A), but increases the latency to generalized seizures (B) induced by PTZ (70 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis test). Data are median and interquartile

ranges for $n=4-11$ in each group. Representative EEGs of vehicle- (0.85% NaCl, C-E) and traxoprodil-injected animals (20 nmol/site; i.c.v., F-H). The arrow indicates PTZ administration. EEG recordings delimited by boxes D, G and E, H are respectively associated with clonic and generalized tonic-clonic seizures, whose expanded views are shown in D, E, G and H recordings.

Table 2.

Effect of Traxoprodil (60 mg/kg, p.o.) on the latency to clonic, generalized tonic–clonic seizures and time spent in generalized seizures induced by PTZ (70 mg/kg, i.p.).

Treatment	Vehicle (n=3)	Traxoprodil (60 mg/kg, n=6)
Latency to clonic seizure (s)	46 (45-59)	66 (58-139)*
Latency to generalized seizure (s)	60 (53-83)	93 (63-410)*
Time spent in generalized seizure (s)	180 ±7.8	64 ±12.5*

* $P < 0.05$, compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis or Student T-test). Data are presented as median and interquartile ranges or as means and standard error of the mean (S.E.M.).

Figure 3

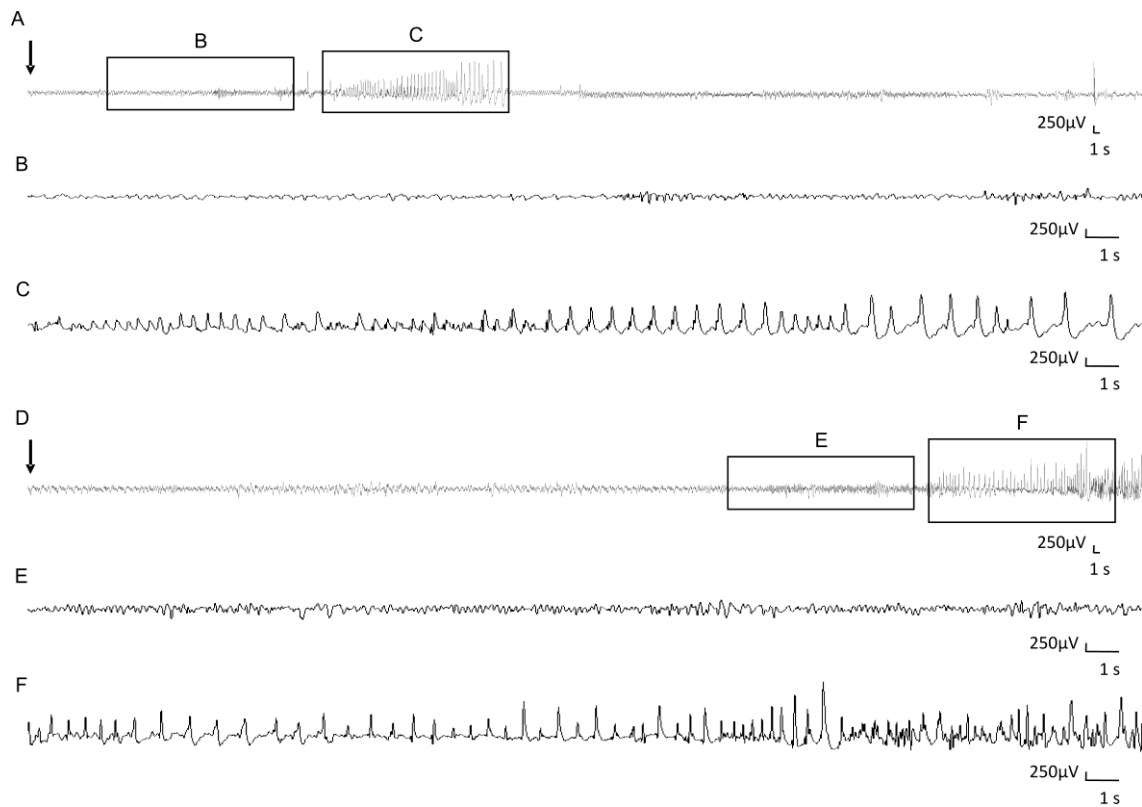


Figure 3. Representative EEG recordings of rats injected with vehicle (0.85% NaCl, 2 µl/site; i.c.v., A-C) or traxoprodil (60 mg/kg, p.o., D-F) showing respective clonic (boxes B and E) and generalized tonic –clonic seizures (boxes C and F) induced by PTZ (70 mg/kg, i.p). EEG traces delimited by boxes B, C, E and F are shown in detail in B, C, E and F recordings, respectively. In all traces the arrow indicates PTZ (70 mg/kg i.p.) administration.

REFERENCES

- Anderson DJ, Crossland J, Shaw GG (1975) The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. *Neuropharmacology* 14:571-577.
- Bausch SB, He S, Dong Y (2010) Inverse relationship between seizure expression and extrasynaptic NMDAR function following chronic NMDAR inhibition. *Epilepsia* 51 Suppl 3:102-105.
- Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M, Sirinathsinghji D, Hill RG, Rupniak NM (1999) Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* 38:611-623.
- Charton JP, Herkert M, Becker CM, Schroder H (1999) Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Res* 816:609-617.
- Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM (2001) NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci* 22:636-642.
- Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K (2009) Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 163:490-499.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.
- De Sarro GB, Ascoti, C., Bagetta, G., Libri, V., Nistoco, G.Jr. (1986) *Behavioural and electrocortical changes of the polyamines after microinfusion in several areas of the rat brain.* Raven Press, New York.

Di X, Bullock R, Watson J, Fatouros P, Chenard B, White F, Corwin F (1997) Effect of CP101,606, a novel NR2B subunit antagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, on the volume of ischemic brain damage off cytotoxic brain edema after middle cerebral artery occlusion in the feline brain. *Stroke* 28:2244-2251.

Doyle KM, Shaw GG (1998) Investigation of the actions and antagonist activity of some polyamine analogues in vivo. *Br J Pharmacol* 124:386-390.

Elsas SM, Hazany S, Gregory WL, Mody I (2009) Hippocampal zinc infusion delays the development of afterdischarges and seizures in a kindling model of epilepsy. *Epilepsia* 50:870-879.

Fage D, Voltz C, Scatton B, Carter C (1992) Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J Neurochem* 58:2170-2175.

Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (1999) Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733-6739.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.

Gallagher MJ, Huang H, Grant ER, Lynch DR (1997) The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 272:24971-24979.

Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA (2001) Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21:8523-8537.

Gomes GM, Mello CF, da Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S, Rubin MA (2010) Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 93:589-595.

Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB (1988) Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12:421-430.

Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227:1496-1499.

Guscott MR, Clarke HF, Murray F, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH (2003) The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* 476:193-199.

Harman RJ, Shaw GG (1981a) High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem* 36:1609-1615.

Harman RJ, Shaw GG (1981b) The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. *Br J Pharmacol* 73:165-174.

Harty TP, Rogawski MA (2000) Felbamate block of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res* 39:47-55.

Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46:261-274.

Hayashi Y, Hattori Y, Hori Y (1992) Involvement of putrescine in the development of kindled seizure in rats. *J Neurochem* 58:562-566.

Hayashi Y, Hattori Y, Moriwaki A, Lu YF, Hori Y (1993) Increases in brain polyamine concentrations in chemical kindling and single convulsion induced by pentylentetrazol in rats. *Neurosci Lett* 149:63-66.

Kaasinen SK, Grohn OH, Keinänen TA, Alhonen L, Janne J (2003) Overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase elevates the threshold to pentylentetrazol-induced seizure activity in transgenic mice. *Exp Neurol* 183:645-652.

Kauppinen RA, Alhonen LI (1995) Transgenic animals as models in the study of the neurobiological role of polyamines. *Prog Neurobiol* 47:545-563.

Kharatishvili I, Immonen R, Grohn O, Pitkanen A (2007) Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 130:3155-3168.

Kirby BP, Shaw GG (2005) Effect of spermine and N1-dansyl-spermine on epileptiform activity in mouse cortical slices. *Eur J Pharmacol* 524:53-59.

Kohr G, Heinemann U (1989) Effects of NMDA antagonists on picrotoxin-, low Mg^{2+} - and low Ca^{2+} -induced epileptogenesis and on evoked changes in extracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations in rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 4:187-200.

Laschet J, Trottier S, Leviel V, Guibert B, Bansard JY, Chauvel P, Bureau M (1999) Heterogeneous distribution of polyamines in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 35:161-172.

Loftis JM, Janowsky A (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97:55-85.

Loscher W, Schmidt D (1994) Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation? *Epilepsy Res* 17:95-134.

Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11062-11067.

McColl CD, Horne MK, Finkelstein DI, Wong JY, Berkovic SF, Drago J (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234-243.

Møllergaard P, Bengtsson F, Smith ML, Riesenfeld V, Siesjö BK (1989) Time course of early brain edema following reversible forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20:1565-1570.

Menniti F, Chenard B, Collins M, Ducat M, Shalaby I, White F (1997) CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol* 331:117-126.

Menniti FS, Pagnozzi MJ, Butler P, Chenard BL, Jaw-Tsai SS, Frost White W (2000) CP-101,606, an NR2B subunit selective NMDA receptor antagonist, inhibits NMDA and injury induced c-fos expression and cortical spreading depression in rodents. *Neuropharmacology* 39:1147-1155.

Merchant RE, Bullock MR, Carmack CA, Shah AK, Wilner KD, Ko G, Williams SA (1999) A double-blind, placebo-controlled study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of CP-101,606 in patients with a mild or moderate traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 890:42-50.

Monaghan DT, Jane DE (2008) Biology of the NMDA Receptor. In Van Dongen AM, (ed) *Frontiers in Neuroscience*, CRC Press, Boca Raton.

Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 157:1301-1317.

Niemann S, Kanki H, Fukui Y, Takao K, Fukaya M, Hynynen MN, Churchill MJ, Shefner JM, Bronson RT, Brown RH, Jr., Watanabe M, Miyakawa T, Itohara S, Hayashi Y (2007) Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and nonmotoneuronal phenotypes. *Eur J Neurosci* 26:1407-1420.

Okiyama K, Smith DH, White WF, Richter K, McIntosh TK (1997) Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 14:211-222.

Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416-426.

Palmer GC (2001) Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets* 2:241-271.

Palmer GC, Murray RJ, Cramer CL, Stagnitto ML, Knowles MK, Freedman LR, Eismann MS, Mahmood N, Balestra M, Borrelli AR, Hudzik TJ, McCarthy DJ (1999) [S]-AR-R 15896AR-A novel anticonvulsant: acute safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 288:121-132.

Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39-47.

Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Hartmann S, Danysz W (1995) Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 34:1239-1258.

Pisani A, Stefani A, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G, Calabresi P (1995) Electrophysiological actions of felbamate on rat striatal neurones. *Br J Pharmacol* 116:2053-2061.

Rho JM, Donevan SD, Rogawski MA (1994) Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Ann Neurol* 35:229-234.

Rogawski MA (1992) The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy. A status report. *Drugs* 44:279-292.

Rogawski MAY, S-I.; Jones, S.M.; Rice, K.C.; Thurkauf, A. and Monn, J.A. (1991) Anticonvulsant activity of the low-affinity uncompetitive N-methyl-D- aspartate antagonist (+)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H- dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (ADCI): comparison with the structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 259:30-37.

Shimosato K, Watanabe S, Katsura M, Ohkuma S (1997) Role of cerebral spermidine in the development of sensitization to convulsant activity of cocaine and lidocaine. *Brain Res* 775:198-202.

Sveinbjornsdottir S, Sander JW, Upton D, Thompson PJ, Patsalos PN, Hirt D, Emre M, Lowe D, Duncan JS (1993) The excitatory amino acid antagonist D-CPP-ene (SDZ EAA-494) in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 16:165-174.

Swinyard EAS, R.D. and Kupferberg, H.J (1986) Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of felbamate and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats. *Epilepsia* 27:27-34.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.

Turecek R, Vlcek K, Petrovic M, Horak M, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. (2004) Intracellular spermine decreases open probability of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neuroscience* 125:879-887.

Wasterlain CG, Chen JW (2008) Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. *Epilepsia* 49 Suppl 9:63-73.

Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-108.

Waxman SG, Geschwind N (2005) Hypergraphia in temporal lobe epilepsy. 1974. *Epilepsy Behav* 6:282-291.

Wedgwood MA, Wolstencroft JH (1977) Effects of spermine and spermidine on single brain stem neurones. *Neuropharmacology* 16:445-446.

White SH, Smith-Yockman M, Srivastava A, Wilcox KS (2006) Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé S, (eds) *Models of Seizures and Epilepsy*, Elsevier, Burlington, MA, pp. 539-549.

Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-859.

Williams K (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 (Pt 2):289-297.

Williams K (2009) *Extracellular Modulation of NMDA Receptors*. CRC Press, Boca Raton (FL).

Yen W, Williamson J, Bertram EH, Kapur J (2004) A comparison of three NMDA receptor antagonists in the treatment of prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res* 59:43-50.

Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, Marshall LF (2005) The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22:1428-1443.

5. DISCUSSÃO

Conforme descrito no item 3.3 Epilepsia, da Revisão Bibliográfica, a epilepsia é uma condição neurológica crônica com incidência alta na população em geral (Dichter et al 2007), e que tem conseqüências importantes em termos de qualidade de vida da população afetada. O tratamento farmacológico das epilepsias é ineficaz para o controle das convulsões em aproximadamente 25-30% dos pacientes (Ben-Menachem et al 2007), o que impacta em um alto custo social e financeiro para a sociedade. Assim, é importante a busca por novas drogas anticonvulsivantes.

Neste estudo mostramos que a administração intracerebroventricular de traxoprodil (20 nmol/sítio) aumenta a latência para convulsão tônico-clônica generalizada induzida pelo PTZ. A administração oral de traxoprodil (60 mg/kg) não somente aumentou as latências para convulsão clônica e tônico-clônica generalizada, quanto também diminuiu a duração total das convulsões generalizadas, consolidando seu papel como anticonvulsivante. Por outro lado, a administração concomitante de espermidina (2 nmol/sítio, i.c.v.) e uma dose subconvulsivante de PTZ (35 mg/kg) induziu ao aparecimento de convulsões clônicas e tônico-clônica generalizadas.

As poliaminas são aminas positivamente carregadas encontradas em concentrações submilimolares, no espaço intra e extracelular no SNC (Turecek et al. 2004). Seu papel fisiológico ainda não está claro (Williams, 2009), contudo, pelo menos um sítio de ligação na superfície extracelular da subunidade NR2B do NMDAr já foi descrita (Gallagher et al. 1997). Além disso, foi demonstrado que a espermidina é captada por um mecanismo de alta afinidade dependente de Na^+ e energia, em preparações de tecido encefálico (Harman and Shaw 1981a) e liberada por despolarizações induzidas por K^+ e oubaína (Fage et al. 1992; Harman and Shaw 1981b). Interessantemente, a ativação dos NMDAr produz uma liberação maciça de espermidina (Fage et al. 1992). Conseqüentemente, a identificação de (1) um sítio de ação extracelular com estrutura específica para as poliaminas, (2) liberação de poliaminas ao meio extracelular, (3) um sistema de captação de poliaminas dependente de Na^+ fortemente sugerem que essas moléculas exercem função fisiológica extracelular no SNC (Kauppinen and Alhonen 1995).

Há tempos sabe-se que, as poliaminas facilitam descarga neuronal (Wedgwood and Wolstencroft 1977), levam a atividade eletrocortical epiléptica em ratos (De Sarro 1986), camundongos e coelhos (Anderson et al. 1975). Além disso, espermidina aumenta a convulsão induzida por NMDLA, cocaína e lidocaína, sugerindo que ela facilita as convulsões moduladas via NMDAr (Shimosato et al. 1997). A superexpressão da N-1-acetiltransferase, a enzima que é responsável pela degradação das poliaminas no SNC, eleva a suscetibilidade as convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos transgênicos (Kaasinen et al. 2003). Em concordância com esses resultados, (Kirby and Shaw 2005), sugeriram que a n-1-dansilepermina, um potente antagonista das poliaminas, pode controlar a atividade epileptiforme *in vitro* e as convulsões induzidas por poliaminas *in vivo*. Também foi sugerido que o aumento do conteúdo de poliaminas em encéfalo humano pode contribuir com a perda do controle da excitabilidade em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Laschet et al. 1999). Assim, o achado relatado neste trabalho, de que a espermidina diminui o limiar de convulsão induzido pelo PTZ, reforça os resultados de estudos prévios que também demonstraram que o limiar convulsivante pode ser acessado através de um protocolo que utiliza doses normalmente subconvulsivantes de PTZ (aproximadamente 30 mg/kg) (Golarai et al. 2001; Kharatishvili et al. 2007). Contudo, é interessante levar em consideração que a espermidina não alterou as convulsões induzidas por dose plena de PTZ (70 mg/kg). É possível que a dose de 70 mg/kg de PTZ atinja o efeito máximo em termos de gravidade da convulsão. Como resultado disso, seria difícil, diminuir adicionalmente as latências das convulsões clônicas e tônico-clônicas generalizadas. Neste sentido, nosso resultado também está de acordo com o estudo que mostra que a espermidina não facilita as convulsões induzidas por PTZ (Shimosato et al. 1997).

Neste trabalho nós mostramos que a administração intracerebroventricular de traxoprodil diminui a latência para convulsão tônico-clônicas, porém não para as convulsões clônicas. Por outro lado, a administração oral do traxoprodil diminui ambos os tipos de convulsão, clônica e tônico-clônica generalizada, além de diminuir a duração total das convulsões. Há inúmeras diferenças entres os dois meios de administração do traxoprodil que podem explicar sua eficácia distinta, como a quantidade de droga que atinge o SNC, a distribuição heterogênea da droga no SNC, a concentração da droga em um núcleo cerebral específico, dentre outras. Independente da causa desta discrepância, é interessante ressaltar que todos os antagonistas NMDAr inibem a extensão tônica da

pata traseira e diminuem a mortalidade causada pelo PTZ (Palmer et al. 1999; Parsons et al. 1995). Entretanto, somente um número limitado deles previnem ambas as convulsões tônico-clônicas e clônicas, incluindo a MK-801, D-CPP, ADCI, felbamato (Palmer et al. 1999; Rogawski et al. 1991; Swinyard et al. 1986), e o traxoprodil, relatado neste estudo.

Já que a espermidina e o traxoprodil ligam-se no NTD da subunidade NR2B do NMDAr (Gallagher et al. 1997), nós investigamos se esta poliamina previne o efeito anticonvulsivante da administração intracerebroventricular de traxoprodil. Entretanto, o traxoprodil diminuiu as convulsões independente da presença de SPD, uma vez que a análise estatística mostrou somente um efeito significativo do traxoprodil (dado não mostrado). Tal resultado está de acordo com os estudos recentes que mostram que as poliaminas e os compostos relacionados ao traxoprodil ligam-se em sítios distintos da subunidade NR2B (Paoletti and Neyton 2007). Logo, considerando que a SPD e o traxoprodil ligam-se em sítios distintos, não é surpreendente que a SPD (em doses que não alteram as convulsões induzidas por PTZ) não reverta o efeito anticonvulsivante do traxoprodil.

Resumindo, neste estudo nós descrevemos a atividade anticonvulsivante do traxoprodil, no modelo de convulsão induzida pelo PTZ e que a espermidina facilita o aparecimento de convulsões em animais injetados com uma dose subconvulsivante de PTZ. Levando em consideração que a dose oral de traxoprodil (60 mg/kg) utilizada ocupa cerca de 100% dos receptores NR2B de hipocampo de ratos (Guscott et al. 2003) e não tem efeito considerável sobre a memória (Guscott et al. 2003), é possível cogitar que o traxoprodil, ou outro derivado relacionado, possa ser utilizado para o desenvolvimento de um antagonista do NMDAr com menos efeito negativos sobre as funções cognitivas, com uso potencial na epilepsia em humanos. Esses dados são particularmente estimulantes quando se considera que em um ensaio clínico de fase I, efeitos colaterais mínimos foram observados em voluntários saudáveis tratados com traxoprodil em doses até 3 mg/kg/h. Entretanto, o uso prolongado com doses de 2,5 mg/kg/15 minutos seguidos de 0.3 mg/kg/h por aproximadamente 70 horas causou dormência facial, náusea, cefaléia, tontura, amnésia, ansiedade e inflamação no sítio de injeção (Palmer 2001). Portanto, estudos adicionais são necessários para estabelecer a janela terapêutica e a concentração plasmática necessárias para determinar a atividade

anticonvulsivante do traxoprodil, e se a administração oral crônica é bem tolerada em humanos.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

1. A espermidina i.c.v. potencializa as convulsões induzidas por PTZ em doses subconvulsivante (35 mg/kg i.p.)
2. A administração i.c.v. de traxoprodil previne as convulsões tônico-clônicas induzidas por PTZ.
3. A administração via oral (v.o.) de traxoprodil previne as convulsões clônicas e tônico-clônicas induzidas por PTZ.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M. 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298(5594):846-850.
- Adeagbo AS. 1984. Vascular relaxation by ifenprodil in the isolated perfused rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 6(6):1142-1147.
- Anderson DJ, Crossland J, Shaw GG. 1975. The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. *Neuropharmacology* 14(8):571-577.
- Araneda RC, Lan JY, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV. 1999. Spermine and arcaine block and permeate N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* 76(6):2899-2911.
- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626(1):49-56.
- Bath CP, Farrell LN, Gilmore J, Ward MA, Hicks CA, O'Neill MJ, Bleakman D. 1996. The effects of ifenprodil and eliprodil on voltage-dependent Ca²⁺ channels and in gerbil global cerebral ischaemia. *Eur J Pharmacol* 299(1-3):103-112.
- Bazil CW, Pedley TA. 1998. Advances in the medical treatment of epilepsy. *Annu Rev Med* 49:135-162.
- Bear MFC, B.W. ; Paradiso M.A. 2006. *Neuroscience: Exploring the Brain* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ben-Menachem E, Biton V, Jatuzis D, Abou-Khalil B, Doty P, Rudd GD. 2007. Efficacy and safety of oral lacosamide as adjunctive therapy in adults with partial-onset seizures. *Epilepsia* 48(7):1308-1317.
- Benveniste M, Mayer ML. 1993. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 464:131-163.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51(4):676-685.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39.
- Bowie D, Mayer ML. 1995. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15(2):453-462.
- Browne TR, Holmes GL. 2001. Epilepsy. *N Engl J Med* 344(15):1145-1151.
- Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF. 1995. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke* 26(11):2187-2189.
- Carter C. 1994. *The Neuropharmacology of Polyamines*. Jenner P, editor: Academic Press.
- Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F, Lloyd KG, Arbilla S, Zivkovic B, MacKenzie ET, et al. 1988. Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* 247(3):1222-1232.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415(6873):793-798.
- Chenard BL, Bordner J, Butler TW, Chambers LK, Collins MA, De Costa DL, Ducat MF, Dumont ML, Fox CB, Mena EE, et al. 1995. (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-

- phenylpiperidino)-1-propanol: a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. *J Med Chem* 38(16):3138-3145.
- Chizh BA, Headley PM. 2005. NMDA antagonists and neuropathic pain--multiple drug targets and multiple uses. *Curr Pharm Des* 11(23):2977-2994.
- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Haganir RL. 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24(45):10248-10259.
- Contreras PC, Bremer ME, Gray NM. 1990. Ifenprodil and SL 82.0715 potently inhibit binding of [3H](+)-3-PPP to sigma binding sites in rat brain. *Neurosci Lett* 116(1-2):190-193.
- Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K. 2009. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 163(1):490-499.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004(255):re16.
- Czuczwar SJ, Meldrum B. 1982. Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Eur J Pharmacol* 83(3-4):335-338.
- De Sarro GB, Ascioti, C., Bagetta, G., Libri, V., Nistico, G.Jr. 1986. Behavioural and electrocortical changes of the polyamines after microinfusion in several areas of the rat brain. Nistico G, Morselli, P.L., Lloyd, K.G., Fariello, R.G., Engel, J. Jr, editor. New York: Raven Press.
- De Sarro GB, De Sarro A. 1993. Anticonvulsant properties of non-competitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate receptor in genetically epilepsy-prone rats: comparison with CPPene. *Neuropharmacology* 32(1):51-58.
- Dichter MA. 1989. Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* 30 Suppl 1:S3-12; discussion S64-18.
- Dichter MA, Hauser WA, Vinters HV, Pedley TA (2007) Epidemiology, Pathology and Genetics of Epilepsy. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, 2nd Edition (Engel J, Pedley TA, Aicardi J, Dichter MA, Moshé SL, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1):7-61.
- Doyle KM, Shaw GG. 1996. Investigation of the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor macrocomplex in the development of spermine-induced CNS excitation in vivo. *Br J Pharmacol* 117(8):1803-1808.
- Elger CE, Helmstaedter C, Kurthen M. 2004. Chronic epilepsy and cognition. *Lancet Neurol* 3(11):663-672.
- Elgersma Y, Silva AJ. 1999. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 9(2):209-213.
- Fage D, Voltz C, Scatton B, Carter C. 1992. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J Neurochem* 58(6):2170-2175.
- Ficker E, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 266(5187):1068-1072.
- Furukawa H, Gouaux E. 2003. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22(12):2873-2885.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438(7065):185-192.
- Gallagher MJ, Huang H, Grant ER, Lynch DR. 1997. The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 272(40):24971-24979.

- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P. 2008. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57(1):80-93.
- Giffard RG, Monyer H, Christine CW, Choi DW. 1990. Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 506(2):339-342.
- Gilad GM, Gilad VH, Wyatt RJ. 1992. Polyamines modulate the binding of GABAA-benzodiazepine receptor ligands in membranes from the rat forebrain. *Neuropharmacology* 31(9):895-898.
- Goebel DJ, Poosch MS. 1999. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69(2):164-170.
- Gogas KR. 2006. Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6(1):68-74.
- Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA. 2001. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21(21):8523-8537.
- Gomes GM, Mello CF, da Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S, Rubin MA. 2010. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 93(4):589-595.
- Guscott MR, Clarke HF, Murray F, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH. 2003. The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* 476(3):193-199.
- Hardingham GE. 2009. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 6):1147-1160.
- Hardingham GE, Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26(2):81-89.
- Harman RJ, Shaw GG. 1981a. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem* 36(5):1609-1615.
- Harman RJ, Shaw GG. 1981b. The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. *Br J Pharmacol* 73(1):165-174.
- Harty TP, Rogawski MA. 2000. Felbamate block of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res* 39(1):47-55.
- Herin GA, Aizenman E. 2004. Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500(1-3):101-111.
- Hernandez TD. 1997. Preventing post-traumatic epilepsy after brain injury: weighing the costs and benefits of anticonvulsant prophylaxis. *Trends Pharmacol Sci* 18(2):59-62.
- Higgins GA, Ballard TM, Enderlin M, Haman M, Kemp JA. 2005. Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 179(1):85-98.
- Hironaka N, Niki H. 2000. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor subunit antagonists on regulation of susceptibility to audiogenic seizures in rats. *Neurosci Lett* 288(2):139-142.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268(4):2836-2843.
- Kaasinen SK, Grohn OH, Keinanen TA, Alhonen L, Janne J. 2003. Overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase elevates the threshold to pentylenetetrazol-induced seizure activity in transgenic mice. *Exp Neurol* 183(2):645-652.

- Kauppinen RA, Alhonen LI. 1995. Transgenic animals as models in the study of the neurobiological role of polyamines. *Prog Neurobiol* 47(6):545-563.
- Kemp JA, McKernan RM. 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.
- Kew JN, Kemp JA. 1998. An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* 512 (Pt 1):17-28.
- Kharatishvili I, Immonen R, Grohn O, Pitkanen A. 2007. Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 130(Pt 12):3155-3168.
- Kirby BP, Shaw GG. 2004. The neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in the gerbil model of cerebral ischaemia. *Brain Res* 1011(1):74-83.
- Kirby BP, Shaw GG. 2005. Effect of spermine and N1-dansyl-spermine on epileptiform activity in mouse cortical slices. *Eur J Pharmacol* 524(1-3):53-59.
- Kleckner NW, Glazewski JC, Chen CC, Moscrip TD. 1999. Subtype-selective antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by felbamate: insights into the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 289(2):886-894.
- Kojima N, Ishibashi H, Obata K, Kandel ER. 1998. Higher seizure susceptibility and enhanced tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in fyn transgenic mice. *Learn Mem* 5(6):429-445.
- Kraus JE, McNamara JO. 1998. Measurement of NMDA receptor protein subunits in discrete hippocampal regions of kindled animals. *Brain Res Mol Brain Res* 61(1-2):114-120.
- Kraus JE, Yeh GC, Bonhaus DW, Nadler JV, McNamara JO. 1994. Kindling induces the long-lasting expression of a novel population of NMDA receptors in hippocampal region CA3. *J Neurosci* 14(7):4196-4205.
- Laschet J, Trottier S, Grisar T, Leviel V. 1992. Polyamine metabolism in epileptic cortex. *Epilepsy Res* 12(2):151-156.
- Laschet J, Trottier S, Leviel V, Guibert B, Bansard JY, Chauvel P, Bureau M. 1999. Heterogeneous distribution of polyamines in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 35(2):161-172.
- Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA. 2003. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging* 24(8):1113-1121.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT. 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27(11):2846-2857.
- Loftis JM, Janowsky A. 2003. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97(1):55-85.
- Loring DW, Meador KJ. 2001. Cognitive and behavioral effects of epilepsy treatment. *Epilepsia* 42 Suppl 8:24-32.
- Loscher W. 2002. 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* 50(1-2):105-123.
- Löscher W. 1998. Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Progress in Neurobiology* 54(6):721-741.
- Loscher W, Nolting B, Honack D. 1988. Evaluation of CPP, a selective NMDA antagonist, in various rodent models of epilepsy. Comparison with other NMDA antagonists, and with diazepam and phenobarbital. *Eur J Pharmacol* 152(1-2):9-17.
- Lowenstein D. 2001. Epilepsy after head injury: the impact of impact. *Ann Neurol* 50(6):696-697.

- Lowenstein DH. 2008. Seizures and Epilepsy. In: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill. p 2498.
- Makani S, Chesler M. 2007. Endogenous alkaline transients boost postsynaptic NMDA receptor responses in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27(28):7438-7446.
- Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. 2009. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 158(1):334-343.
- Masuko T, Kashiwagi K, Kuno T, Nguyen ND, Pahk AJ, Fukuchi J, Igarashi K, Williams K. 1999. A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55(6):957-969.
- Masuko T, Kusama-Eguchi K, Sakata K, Kusama T, Chaki S, Okuyama S, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K. 2003. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J Neurochem* 84(3):610-617.
- Mataro-Serrat M, Junque-Plaja C. 1997. [Memory and epilepsy]. *Rev Neurol* 25(144):1241-1245.
- Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli L, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Adelson PD. 1998. Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(6):615-634.
- Mayer ML. 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440(7083):456-462.
- McAllister KH. 1992. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and channel blockers have different effects upon a spinal seizure model in mice. *Eur J Pharmacol* 211(1):105-108.
- McBain CJ, Mayer ML. 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74(3):723-760.
- McCabe PH. 2000. New anti-epileptic drugs for the 21st century. *Expert Opin Pharmacother* 1(4):633-674.
- McNamara JO, Russell RD, Rigsbee L, Bonhaus DW. 1988. Anticonvulsant and antiepileptogenic actions of MK-801 in the kindling and electroshock models. *Neuropharmacology* 27(6):563-568.
- Meador KJ. 2008. Cognitive Effects of Levetiracetam versus Topiramate. *Epilepsy Curr* 8(3):64-65.
- Meador KJ, Gevins A, Loring DW, McEvoy LK, Ray PG, Smith ME, Motamedi GK, Evans BM, Baum C. 2007. Neuropsychological and neurophysiologic effects of carbamazepine and levetiracetam. *Neurology* 69(22):2076-2084.
- Menniti F, Chenard B, Collins M, Ducat M, Shalaby I, White F. 1997. CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol* 331(2-3):117-126.
- Menniti FS, Pagnozzi MJ, Butler P, Chenard BL, Jaw-Tsai SS, Frost White W. 2000. CP-101,606, an NR2B subunit selective NMDA receptor antagonist, inhibits NMDA and injury induced c-fos expression and cortical spreading depression in rodents. *Neuropharmacology* 39(7):1147-1155.
- Monaghan DT, Cotman CW. 1985. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5(11):2909-2919.
- Monaghan DT, Jane DE. 2009. Pharmacology of NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton: CRC Press.
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. 2009a. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 157(8):1301-1317.

- Mony L, Krzaczkowski L, Leonetti M, Le Goff A, Alarcon K, Neyton J, Bertrand HO, Acher F, Paoletti P. 2009b. Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 75(1):60-74.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256(5060):1217-1221.
- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R. 1998. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* 1(8):659-667.
- Moult PR. 2009. Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 6):1317-1322.
- Mula M, Monaco F. 2009. Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. *Epileptic Disord* 11(1):1-9.
- Narita M, Aoki T, Suzuki T. 2000. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference. *Neuroscience* 101(3):601-606.
- Nutt JG, Gunzler SA, Kirchoff T, Hogarth P, Weaver JL, Krams M, Jamerson B, Menniti FS, Landen JW. 2008. Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. *Mov Disord* 23(13):1860-1866.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER. 1993. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11(1):41-52.
- Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E, Jay TM. 2000. Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 18(2-3):281-287.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5):581-618.
- Palmer GC. 2001. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets* 2(3):241-271.
- Palmer GC, Murray RJ, Cramer CL, Stagnitto ML, Knowles MK, Freedman LR, Eismann MS, Mahmood N, Balestra M, Borrelli AR, Hudzik TJ, McCarthy DJ. 1999. [S]-AR-R 15896AR-A novel anticonvulsant: acute safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 288(1):121-132.
- Paoletti P, Neyton J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7(1):39-47.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J. 2000. Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28(3):911-925.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G. 1998. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug News Perspect* 11(9):523-569.
- Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Hartmann S, Danysz W. 1995. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 34(10):1239-1258.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P. 2002. Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* 22(14):5955-5965.
- Perucca E, French J, Bialer M. 2007. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 6(9):793-804.
- Pollard JR, French J. 2006. Antiepileptic drugs in development. *Lancet Neurol* 5(12):1064-1067.

- Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW. 2008. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28(6):631-637.
- Prybylowski K, Wenthold RJ. 2004. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem* 279(11):9673-9676.
- Ramage L, Martel MA, Hardingham GE, Salter DM. 2008. NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16(12):1576-1584.
- Ransom RW, Stec NL. 1988. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 51(3):830-836.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140(1-2):1-47.
- Rogawski MA. 1992. The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy. A status report. *Drugs* 44(3):279-292.
- Rogawski MA, Loscher W. 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5(7):553-564.
- Rogawski MA, Yamaguchi S, Jones SM, Rice KC, Thurkauf A, Monn JA. 1991. Anticonvulsant activity of the low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist (+)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (ADCl): comparison with the structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 259(1):30-37.
- Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. 1996. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 28(8):843-861.
- Shimosato K, Watanabe S, Katsura M, Ohkuma S. 1997. Role of cerebral spermidine in the development of sensitization to convulsant activity of cocaine and lidocaine. *Brain Res* 775(1-2):198-202.
- Singh L, Oles R, Woodruff G. 1990. In vivo interaction of a polyamine with the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 180(2-3):391-392.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8):1051-1058.
- Sveinbjornsdottir S, Sander JW, Upton D, Thompson PJ, Patsalos PN, Hirt D, Emre M, Lowe D, Duncan JS. 1993. The excitatory amino acid antagonist D-CPP-ene (SDZ EAA-494) in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 16(2):165-174.
- Swinyard EA, Sofia RD, Kupferberg HJ. 1986. Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of felbamate and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats. *Epilepsia* 27(1):27-34.
- Szczesniak AM, Gilbert RW, Mukhida M, Anderson GI. 2005. Mechanical loading modulates glutamate receptor subunit expression in bone. *Bone* 37(1):63-73.
- Tan PH, Yang LC, Shih HC, Lan KC, Cheng JT. 2005. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther* 12(1):59-66.
- Taylor J, Kolamunnage-Dona R, Marson AG, Smith PE, Aldenkamp AP, Baker GA. 2010. Patients with epilepsy: cognitively compromised before the start of antiepileptic drug treatment? *Epilepsia* 51(1):48-56.
- Temkin NR. 2001. Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials. *Epilepsia* 42(4):515-524.

- Teyler TJ. 1999. Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. *Methods* 18(2):109-116.
- Thierer DE. 2001. [Drug associated memory impairment]. *Vertex* 12(46):272-275.
- Tovar KR, Westbrook GL. 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19(10):4180-4188.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268(5212):873-876.
- Turecek R, Vlcek K, Petrovic M, Horak M, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. 2004. Intracellular spermine decreases open probability of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neuroscience* 125(4):879-887.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F. 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13(1):28-37.
- Walker DL, Davis M. 2008. Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test. *Learn Mem* 15(2):67-74.
- Wang CX, Shuaib A. 2005. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4(2):143-151.
- Wang XM, Bausch SB. 2004. Effects of distinct classes of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on seizures, axonal sprouting and neuronal loss in vitro: suppression by NR2B-selective antagonists. *Neuropharmacology* 47(7):1008-1020.
- Watkins JC, Jane DE. 2006. The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-108.
- Waxman EA, Lynch DR. 2005. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11(1):37-49.
- Wedgwood MA, Wolstencroft JH. 1977. Effects of spermine and spermidine on single brain stem neurones. *Neuropharmacology* 16(6):445-446.
- Williams K. 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44(4):851-859.
- Williams K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 (Pt 2):289-297.
- Williams K. 2009. Extracellular Modulation of NMDA Receptors. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton: CRC Press.
- Williams K, Dawson VL, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. 1990. Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron* 5(2):199-208.
- Williams K, Romano C, Molinoff PB. 1989. Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol Pharmacol* 36(4):575-581.
- Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB. 1994. Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 45(5):803-809.
- Yen W, Williamson J, Bertram EH, Kapur J. 2004. A comparison of three NMDA receptor antagonists in the treatment of prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res* 59(1):43-50.
- Yourick DL, Repasi RT, Rittase WB, Staten LD, Meyerhoff JL. 1999. Ifenprodil and arcaïne alter amygdala-kindling development. *European Journal of Pharmacology* 371(2-3):147-152.
- Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, Marshall LF. 2005. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22(12):1428-1443.
- Zarnowski T, Kleinrok Z, Turski WA, Czuczwar SJ. 1994. The NMDA antagonist procyclidine, but not ifenprodil, enhances the protective efficacy of common antiepileptics against maximal electroshock-induced seizures in mice. *J Neural Transm Gen Sect* 97(1):1-12.

Zhou M, Baudry M. 2006. Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26(11):2956-2963.