

Indução Prévia de LTP na Via CA1-Córtex Pré-Frontal Medial de Ratos Bloqueia os Prejuízos de Plasticidade Pré-Sináptica Induzidos por Modelo de Psicose Pós-Ictal *in vivo**

Lopes-Aguiar C^a, Rossignoli MT^a, Esteves IM^a, Ruggiero RN^a, Bueno Júnior LS^a, Romcy-Pereira RN^b, Leite JP^a

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar se a indução de potenciação de longa duração (LTP) no córtex frontal seria capaz de bloquear os efeitos depressores sobre a plasticidade pré-sináptica da via hipocampo (CA1)-córtex pré-frontal medial (mPFC) induzidos por pós-descarga no hipocampo (AD; atividade epiléptica) ou pela injeção sistêmica de cetamina (KET; modelo farmacológico de psicose). Ratos anestesiados com uretana receberam implantes de eletrodos de estimulação e registro, em CA1 e mPFC, respectivamente. Estímulos elétricos monofásicos pareados foram aplicados em CA1 a cada 20s para eliciar potenciais pós-sinápticos de campo (P1 e P2) no mPFC. Avaliamos a plasticidade de curta duração através da facilitação por pulso pareado (PPF), definida pela razão entre as amplitudes de P2 e P1. Após 90min de registros de linha de base, grupos independentes de animais receberam aplicação de AD, injeção de KET-S(+) (12,5 mg/kg i.p.) ou injeção de veículo (NaCl 0,15M), e foram registrados por mais 120min. Em outro experimento registramos 30min de linha de base e aplicamos estímulos de alta frequência (HFS) para indução de LTP aos 30 e 60min. Trinta minutos depois, os animais receberam KET, AD ou veículo e tiveram seus potenciais corticais registrados por mais 120 min. Nossos resultados mostram que AD gera significativa redução (-50%) da eficiência de transmissão basal na via CA1-mPFC, enquanto KET promove leve aumento (+10%). Ambos os tratamentos também promovem prejuízo significativo da PPF na mesma via (-15%). Além disso, observamos que a indução prévia de LTP atenua as alterações da eficiência basal e bloqueia os prejuízos da PPF na via CA1-mPFC induzidos por KET e AD. Nossos achados reforçam evidências recentes de que moduladores alostéricos positivos de NMDA e AMPA atenuam os prejuízos cognitivos em modelos animais de psicose. Acreditamos, portanto, que a aplicação prévia de HFS na região CA1 do hipocampo pode ser uma ferramenta útil para melhor entendermos como prevenir os prejuízos de plasticidade sináptica no mPFC em modelos de psicose e psicose pós-ictal.

Unitermos: psicose pós-ictal, plasticidade sináptica, via CA1-córtex pré-frontal medial, potenciação de longa duração, pós-descarga, cetamina.

ABSTRACT

Prevention of the CA1-mPFC pre-synaptic plasticity impairments in a post-ictal psychosis model 'in vivo'

The present work aimed to test whether the induction of cortical long-term potentiation (LTP) was able to prevent the presynaptic plasticity impairment in the hippocampus (CA1)-medial prefrontal cortex (mPFC) pathway induced by hippocampal after-discharge (AD; epileptic activity) or systemic injection of ketamine (KET; pharmacological model of psychosis). Electrodes were stereotaxically positioned into CA1 and mPFC in urethane-anesthetized rats. Monophasic paired-pulses of electrical stimuli were applied to CA1 in order to evoke field post-synaptic potentials (P1 and P2) in the mPFC every 20s. Short-term plasticity was evaluated by measuring paired-pulse facilitation (PPF), defined as the amplitude ratio P2/P1. After 90min of baseline

*Trabalho vencedor do Prêmio Aristides Leão – XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia, 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP.

^b Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal-RN.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

recordings, three independent groups of animals received hippocampal-AD, KET-S(+) (12.5mg/kg, i.p.) or vehicle (NaCl 0.15M) followed by 120min of evoked response monitoring. In an additional experiment, two applications of high-frequency stimuli (HFS) were given at 30 and 60min after baseline. Thirty minutes after the second HFS, the rats received KET, AD or vehicle and their cortical evoked potentials were monitored for further 120min. Our results showed that AD significantly decreased (-50%) whereas KET enhanced (+10%) CA1-mPFC basal synaptic transmission. In addition, AD and KET similarly impaired short-term plasticity in the mPFC (-15%). Interestingly, pre-induction of LTP in the mPFC prevented the PPF disruption induced by KET and AD. Altogether, our findings support recent evidences that positive allosteric modulators of NMDA and AMPA receptors attenuate cognitive impairments in animal models of psychosis. We believe that controlled HFS in CA1 can be a useful tool to better understand how to prevent synaptic plasticity disruptions observed in experimental models of psychosis and pos-ictal psychosis.

Keywords: post-ictal psychosis, synaptic plasticity, CA1-medial prefrontal cortex pathway, long-term potentiation, afterdischarge, ketamine.

INTRODUÇÃO

Vários estudos têm mostrado que a incidência de psicose – perturbação que envolve o início súbito de delírios, alucinações, discurso desorganizado ou comportamento amplamente desorganizado ou catatônico – chega a ser três vezes maior em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) do que em casos de epilepsia generalizada^{1,2}. Entretanto, os mecanismos neurais responsáveis pela ocorrência e fenomenologia dos episódios psicóticos em pacientes com epilepsia ainda são pouco compreendidos.

A relação entre psicose e epilepsia tem sido investigada experimentalmente por meio, principalmente, de (1) protocolos de avaliação comportamental em modelos animais de epilepsia (genéticos ou induzidos)^{3,4,5} e de abrasamento límbico (*kindling* do hipocampo e amígdala)^{6,7,8}; (2) protocolos de evocação de pós-descargas (AD) no hipocampo⁹; e (3) tratamentos agudos ou crônicos com antagonistas não competitivos do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)¹⁰.

O modelo de AD única no hipocampo é considerado uma importante ferramenta, pois induz hiperlocomção e movimentos estereotipados, logo que a atividade epileptiforme cessa, reproduzindo alguns aspectos característicos de um episódio psicótico pós-ictal¹¹. Além disso, o prejuízo nas funções do filtro sensorio-motor gerado por indução de AD apresenta-se associado a aumento de oscilações gama (30-100Hz) no hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC), como observado no modelo de psicose induzido por cetamina (KET)¹¹.

Os modelos de psicose gerados pela administração de antagonistas glutamatérgicos como a fenciclidina (PCP), KET ou a dizocilpina (MK-801) são baseados na hipótese de hipofunção glutamatérgica da esquizofrenia¹⁰. Recentemente foi demonstrado que a administração sistêmica de MK-801, além de potencializar oscilações

gama¹², também é capaz de alterar o perfil espectral dentro da faixa de oscilações lentas (0,5-2Hz) no córtex pré-frontal e reduzir a plasticidade sináptica de curta duração na via CA1-mPFC *in vivo*¹³. É interessante notar que ambos os efeitos foram imediatamente revertidos após administração de AMPAcina, um modulador alostérico positivo de receptores AMPA. Ainda em suporte à hipótese glutamatérgica, estudos pré-clínicos com roedores têm mostrado que a inibição de transportadores de glicina (um co-agonista do receptor NMDA) é capaz de (1) reverter a hiperlocomção e o excesso de liberação dopaminérgica, induzidos por PCP¹⁴, (2) potencializar a atividade do mPFC *in vivo*¹⁵ e (3) reverter os prejuízos de memória de trabalho induzidos por KET¹⁶. Uma série de inibidores de alta afinidade para o transportador de glicina têm sido desenvolvidos e também testados, com sucesso, em modelos experimentais de psicose¹⁴, em pacientes com esquizofrenia¹⁷ e em sujeitos sadios submetidos a administração de KET¹⁸. Consistente com esses achados, alguns estudos sugerem que a clozapina, um antipsicótico atípico, funciona pelo menos em parte como um agonista do sítio de glicina presente nos receptores NMDA¹⁴. Portanto, considerando as evidências sobre o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica nas alterações eletrofisiológicas e comportamentais em modelos experimentais de psicose, nosso objetivo foi testar a hipótese de que a potencialização sináptica de longa duração (LTP) cortical é capaz de bloquear os efeitos depressores da injeção sistêmica de KET ou da aplicação de AD hipocampal, sobre a plasticidade pré-sináptica na via hipocampo (CA1)-mPFC *in vivo*.

MÉTODOS

Ratos Wistar adultos machos foram anestesiados com uretana (1,3g/kg, i.p.) para implantação estereotáxica de eletrodos em CA1 e mPFC segundo coordenadas anatômicas de referência¹⁹. No total, três eletrodos foram implantados:

(1) eletrodo monopolar de registro no mPFC; (2) eletrodo bipolar de estímulo na região CA1 do hipocampo posterior dorsal (com desnível entre as pontas de 0,5 mm) e (3) eletrodo monopolar de registro em CA1, localizado 1,5mm anterior ao eletrodo de estímulo. Estímulos monofásicos pareados (0,2ms de duração; intervalo inter-estímulos de 80ms) aplicados em CA1, a cada 20s, foram capazes de eliciar potenciais pós-sinápticos de campo denominados P1 e P2 no mPFC. A facilitação por pulso pareado (PPF) foi definida pela razão entre as amplitudes de P2 e P1, e foi estudada antes e depois da administração de AD-hipocampal, KET-S(+) (12,5 mg/kg i.p.) ou veículo (NaCl 0,15M i.p.).

Em resumo, após 90min de registro de linha de base, três grupos independentes de animais receberam AD-hipocampal, KET-S(+) ou veículo e tiveram seus potenciais monitorados por mais 120min. Para testar os efeitos da LTP sobre a PPF, três novos grupos de animais foram registrados por 30min de linha de base e, em seguida, receberam duas sessões de estímulos em alta frequência (HFS) aos 30 e 60min. Trinta minutos depois, cada grupo recebeu como tratamento AD, KET-S(+) ou veículo e tiveram seus potenciais corticais registrados por mais 120min. A indução de AD-hipocampal foi realizada por um único trem de estímulos em CA1 constituído por 200 pulsos a 20Hz (pulsos monofásicos; 1ms de duração) com duração total de 10 segundos¹¹. A indução de LTP foi realizada por meio da aplicação de HFS, aos 30 e 60min de registro. Cada HFS consistiu de duas séries de 10 trens (50 pulsos a 250Hz; 0,2ms de duração; a cada 10s), separados por 10min²⁰. A corrente de estimulação utilizada em todos os experimentos foi em intensidade capaz de gerar o maior PPF nessa via determinada a partir da curva de calibração¹⁴. Para analisar os potenciais evocados no mPFC consideramos amplitude de P1 e P2 medidas como a distância entre o ponto máximo do primeiro pico positivo e o ponto mínimo do primeiro pico negativo com latência de 16 a 20 ms. Esses valores foram normalizados com relação à linha de base, definida como 100%. Todas as variáveis analisadas apresentaram

distribuição normal e, por isso, utilizamos o teste estatístico ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

RESULTADOS

A Tabela 1 sintetiza os principais efeitos de KET e AD sobre a transmissão e plasticidade pré-sináptica na via CA1-mPFC *in vivo*. Nossos resultados indicam que a injeção sistêmica de KET aumentou significativamente a amplitude do P1 em dois momentos específicos do experimento, de 120 a 130min e 170 a 190min [Interação tratamento-tempo: +10%, Sham-KET vs. Sham-SAL: $F(20, 260)=1,88, p<0.05$; ANOVA de duas vias medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$] sem afetar de maneira significativa o P2 da via CA1-mPFC *in vivo* ($p>0,05$). Em contrapartida, a indução de AD gera uma queda robusta de ambos, P1 [Tratamento: -50%; Sham-AD vs. Sham-Sham: $F(1, 12)=61,95, p<0,001$, ANOVA de duas vias medidas repetidas] e P2 [Tratamento: -60%; $F(1, 12)=95,88, p<0,001$] na mesma via. Além de robusto, esse efeito mostrou ser sustentado, mantendo a queda inicial dos potenciais de 50 a 60% por, no mínimo, 2 horas em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey para P1 e P2; $p<0,05$). Embora KET e AD tenham efeitos bastante distintos sobre a eficiência basal da via CA1-mPFC, ambos geram prejuízo sobre sua plasticidade pré-sináptica, medida por PPF [Tratamento: -15%; Sham-KET vs. Sham-SAL: $F(1, 13)=39,34, p<0,001$ e -13%; Sham-AD vs. Sham-Sham: PPF $F(1, 12)=6,31, p<0,05$, ANOVA de duas vias para medidas repetidas]. A Tabela 2 mostra as principais comparações referentes ao segundo estudo realizado para testar a hipótese de que a LTP seria capaz de bloquear os prejuízos de AD e KET. Observa-se que a indução prévia de LTP previne a queda dos PPF gerada por KET e AD. Ao contrário do experimento anterior, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados com LTP+KET, AD ou SAL [Tratamento: $F(2, 20)=0,089; p=0,9$; ANOVA de duas vias para medidas repetidas].

Tabela 1. Efeitos de KET e AD sobre a eficiência basal e plasticidade pré-sináptica da via CA1-mPFC. P1: amplitude do primeiro potencial evocado no mPFC após estimulação de CA1. P2: amplitude do segundo potencial evocado. PPF: razão entre as amplitudes de P2 e P1.

Comparação	ANOVA duas vias medidas repetidas	Parâmetros	Varição
Sham-KET vs. Sham-SAL	$F(20, 260)=1,88; p<0.05$	P1	10%
Sham-KET vs. Sham-SAL	n.s.	P2	n.s.
Sham-KET vs. Sham-SAL	$F(1, 13)=39,34; p<0,001$	PPF	-15%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=61,95; p<0,001$	P1	-50%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=95,88; p<0,001$	P2	-60%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=6,31; p<0,05$	PPF	-13%

Tabela 2. Efeitos indução prévia de LTP sobre os efeitos depressores de plasticidade pré-sináptica induzidos por KET e AD.

Comparação	ANOVA duas vias medidas repetidas	Parâmetros	Varição
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	P1	n.s.
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	P2	n.s.
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	PPF	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	P1	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	P2	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	PPF	n.s.

CONCLUSÕES

A depressão sináptica observada na via CA1-mPFC gerada por AD pode ser considerada uma nova forma de depressão de longa duração (LTD), neste caso induzida por um evento tipo-ictal, particularmente por ter se mostrado robusta (~50%) e sustentada (duração de 120min). Esta atenuação da resposta do córtex pré-frontal subsequente à atividade epileptiforme hipocampal pode ser responsável por falhas no processamento sináptico límbico-cortical pós-ictal e contribuir para alterações comportamentais observadas neste período. Além disso, os efeitos provenientes de uma única AD são importantes para o entendimento de como crises espontâneas isoladas, da ordem de segundos, podem afetar a comunicação entre áreas de controle executivo interligadas ao foco epiléptico. Por outro lado, o fato da KET e da AD promoverem reduções semelhantes na plasticidade pré-sináptica, mesmo com efeitos distintos nos potenciais evocados basais, sugere que esses tratamentos possam ter atuado diferencialmente nos terminais pré e pós-sinápticos, alterando tanto a eficiência sináptica quanto a excitabilidade local da rede. Por fim, os efeitos da LTP sobre a queda do PPF induzido por KET e AD, estão de acordo com evidências recentes mostrando que a ativação de NMDA e AMPA revertem prejuízos cognitivos em modelos animais de psicose. Consideramos, portanto, que a indução prévia de LTP possa ser uma ferramenta útil para melhor investigarmos como prevenir os prejuízos de plasticidade sináptica no mPFC em modelos de psicose e psicose pós-ictal.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Sra. Renata Scandiuzzi e o Sr. Renato Meirelles, pelo excelente suporte técnico, aos colegas de laboratório, Ana Clara Brogini, Ludmyla Kandratavicius, Raquel do Val da Silva e José Peixoto, pelas valiosas discussões, e às agências financiadoras FAPESP/CInAPCe; FAPESP; CAPES; CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Gaitatzis A, Carroll K, Majeed A, W Sander J. The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population. *Epilepsia*. 2004;45(12):1613-22.
- Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia*. 2007;48(12):2336-44.
- Gorji A, Scheller D, Speckmann EJ. The lateral spread of epileptiform discharges in rat neocortical slices: effect of focal phencyclidine application. *Pharmacopsychiatry*. 2003; 36(3):113-20
- Jones NC, Martin S, Megatia I, Hakami T, Salzberg MR, Pinault D, Morris MJ, O'Brien TJ, van den Buuse M. A genetic epilepsy rat model displays endophenotypes of psychosis. *Neurobiol Dis*. 2010;39(1):116-25.
- Cifelli P, Grace AA. Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012;15(7):957-64.
- Smith PF, Darlington CL. The development of psychosis in epilepsy: a re-examination of the kindling hypothesis. *Behav Brain Res*. 1996;75(1-2):59-66.
- Howland JG, Hannesson DK, Barnes SJ, Phillips AG. Kindling of basolateral amygdala but not ventral hippocampus or perirhinal cortex disrupts sensorimotor gating in rats. *Behav Brain Res*. 2007;177(1):30-6.
- Koch M, Ebert U. Deficient sensorimotor gating following seizures in amygdala-kindled rats. *Biol Psychiatry*. 1998;44(4):290-7.
- McCracken CB, Roberts DCS. A single evoked afterdischarge produces rapid time-dependent changes in connexin36 protein expression in adult rat dorsal hippocampus. *Neurosci. Lett*. 2006; 405(1-2):84-8.
- Corlett PR, Honey GD, Krystal JH, Fletcher PC. Glutamatergic model psychoses: prediction error, learning, and inference. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(1):294-315.
- Ma J, Leung LS. Schizophrenia-like behavioral changes after partial hippocampal kindling. *Brain Res*. 2004;997(1):111-8.
- Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, Rühlmann C, Jones SR, Deisseroth K, Sheng M, Moore CI, Tsai LH. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol Psychiatry*. 2012;17(5):537-48
- Kiss T, Hoffmann WE, Hajós M. Delta oscillation and short-term plasticity in the rat medial prefrontal cortex: modelling NMDA hypofunction of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(1):29-42.
- Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):4-15.

15. Chen L, Muhlhauser M, Yang CR. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *J Neurophysiol.* 2003;89(2):691-703.
16. Roberts BM, Shaffer CL, Seymour PA, Schmidt CJ, Williams GV, Castner SA. Glycine transporter inhibition reverses ketamine induced working memory deficits. *Neuroreport.* 2010;21(5):390-4.
17. Alberati D, Moreau J-L, Lengyel J, Hauser N, Mory R, Borroni E, et al. Glycine reuptake inhibitor RG1678: a pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2012;62(2):1152-61.
18. D'Souza DC, Singh N, Elander J, Carbutto M, Pittman B, de Haes JU, et al. Glycine transporter inhibitor attenuates the psychotomimetic effects of ketamine in healthy males: preliminary evidence. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(4):1036-46.
19. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition: Hard Cover Edition.* 6th ed. Academic Press; 2007.
20. Lopes Aguiar C, Romcy-Pereira RN, Escorsim Szawka R, Galvis-Alonso OY, Anselmo-Franci JA, Pereira Leite J. Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of long-term potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats *in vivo*: a possible involvement of monoaminergic systems. *Neuroscience.* 2008;153(4):1309-19.

Endereço para correspondência:

Rodrigo Romcy-Pereira
Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
CEP 59056-450, Natal, RN, Brasil
Tel.: (+55-84) 8852-1551
E-mail: <rmrpereira@gmail.com>, <rmrpereira@neuro.ufrn.br>.