

EXAME DA ATIVAÇÃO E DA IMUNOMARCAÇÃO DOS INTERNEURÔNIOS GABAÉRGICOS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NO MODELO DO *STATUS EPILEPTICUS* NEONATAL EM RATOS WISTAR MACHOS.

Julia de Souza Almeida Jorge (IC) e Roberta Monterazzo Cysneiros (Orientadora)

Apoio: PIBIC MackPesquisa

RESUMO

Conhecido como uma emergência médica, o *Status epilepticus* (SE) pode desencadear lesões neuronais, coma ou morte em caso de falta de tratamento. Estes danos são variáveis de acordo com a idade, sendo os cérebros adultos e juvenis mais suscetíveis que os neonatais. Estudos com roedores submetidos ao SE neonatal destacam a associação entre o SE e a diminuição de interneurônios GABAérgicos, apresentando grande impacto na sociabilidade, uma vez que as regiões afetadas pertencem à Rede Neural de Tomada de Decisão Social (RNTDS). Dentre essas regiões está o córtex pré-frontal (PFC), o qual possui atividade relacionada aos comportamentos sociais, memória de trabalho, tomada de decisões e orientação a objetivos. O seguinte estudo teve como principal objetivo a imunomarcação dos interneurônios GABAérgicos no PFC-medial, entretanto os resultados não foram conclusivos, possivelmente pela baixa concentração dos anticorpos utilizados. Observou-se também a imunomarcação de fibras nervosas nas regiões hipocampais, de forma que o grupo experimental apresentou uma quantidade menor de interneurônios, indicando um possível impacto negativo a RNTDS e nas interações sociais. Assim, apesar de os resultados da imunomarcação não terem sido de acordo com o esperado, foi possível demonstrar a relação entre o SE e as alterações provocadas no RNTDS, comprometendo as dinâmicas sociais.

Palavras-Chave: *Status epilepticus*; interneurônios, córtex pré-frontal

ABSTRACT:

Known as a medical emergency, *Status epilepticus* (SE) can trigger neuronal damage, coma or death in case of absence of treatment. These damages vary according to age, with adult and young brains being more susceptible than neonatal ones. Studies involving rodents subjected to neonatal SE highlight the association between SE and the reduction of GABAergic interneurons, with a significant impact on sociability since the affected regions belong to the Social Decision Making Neural Network (SDMNN). Among these regions is the pre-frontal cortex (PFC), which is involved in activities related to social behaviors, working memory, decision-making and goal orientation. The main objective of the following study was the immunostaining of GABAergic interneurons in the medial-PFC. However, the results were inconclusive, possibly due to the low concentration of the antibodies used. Immunostaining

of nerve fibers was also observed in the hippocampal regions, with the experimental group showing a lower number of interneurons, suggesting a potential negative impact on SDMNN and social interactions. Therefore, despite the immunostaining results not being according to the expectations, it was possible to demonstrate the relation between the SE and the modifications in the SDMNN compromising social dynamics.

Keywords: *Status epilepticus*; interneurons; pre-frontal cortex

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Comissão de Classificação e Terminologia e a Comissão de Epidemiologia da Liga Internacional Contra Epilepsia (ILEA) definiram e classificaram o Status Epilepticus (SE) como uma condição resultante tanto da falha dos mecanismos responsáveis pelo término de convulsões, quanto pela ativação do mecanismo que resultam em convulsões anormalmente prolongadas. (TRINKA, COCK, HESDORFFER et al., 2015).

O SE é considerado uma emergência clínica, de maneira que as convulsões resultantes dessa condição, caso não sejam devidamente tratadas, podem ocasionar lesões neuronais, coma, grave incapacidade ou morte (TRINKA, COCK, HESDORFFER et al., 2015), sendo estes danos variáveis de acordo com a idade que o evento acontece, de modo que os cérebros adulto e juvenil estão mais suscetíveis que um cérebro imaturo de um neonatal. Dessa forma, os estudos realizados em roedores induzidos ao SE no período neonatal são considerados mais promissores. Além disso, o prejuízo na sociabilidade tem sido alvo de relatos de pacientes com epilepsia do lobo temporal, mesmo sem diagnóstico de autismo (WANG et al., 2015; IVES-DELIPERI e JOKEIT, 2019), em ratos com lesão hipocampal (MAASWINKEL et al., 1996) e em ratos com epilepsia do lobo temporal (MARIN et al., 2008), mas os mecanismos não são conhecidos.

A perda do interesse social dos roedores foi constatada com um dos principais impactos neuronais causados pela crise epiléptica neonatal, mas sem haver perda na capacidade de aprendizagem associativa, memória a longo prazo e memória de trabalho (BARBOSA et al., 2017; PACÍFICO et al., 2020). A redução na motivação social foi relacionada, em estudos anteriores, pela diminuição da atividade dos receptores de ocitocina (OTR) localizados no hipocampo e da retenção de ocitocina (OT) no hipotálamo (PACÍFICO et al., 2020). Assim, os resultados indicam que as crises epilépticas afetam com maior facilidade a Rede Neural de Tomada de Decisão Social (RNTDS) do que outras regiões envolvidas com funções cognitivas mediadas pelo hipocampo. O córtex pré-frontal (PFC) é um dos componentes do RNTDS, o qual está relacionado a uma ampla variedade de comportamentos, incluindo tomada de decisões, comportamentos orientados para objetivos, memória de trabalho e comportamento social (BICKS et al., 2015). Na presente pesquisa a abordagem foi baseada na concordância de que o desequilíbrio entre excitação e inibição (E/I) no PFC está diretamente ligado aos prejuízos comportamentais regularmente analisados nos transtornos de neurodesenvolvimentos, como o TEA. Além disso, múltiplos episódios de SE neonatal (P7-P9) em ratos geram alterações na imunomarcagem para interneurônios positivos para parvalbumina (PV+) no neocórtex e, que em camundongos, os interneurônios PV+ do córtex

pré-frontal são ativados durante a interação social e sua inativação causa um prejuízo social. Assim nossa hipótese foi que neste modelo teríamos alteração na sinalização GABAérgica no córtex pré-frontal medial (PFCm), sendo de forma inédita as estratégias metodológicas constatarem se os prejuízos sociais observados neste modelo estão associados a integração dos interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina e somatostatina no PFCm.

Portanto, os objetivos deste projeto incluíram o exame da ativação dos interneurônios GABAérgicos presentes no PFC e sua relação com os prejuízos na sociabilidade no modelo do SE neonatal, suspeitando que a imunomarcagem para a proteína c-fos, além da imunomarcagem das proteínas ligantes de cálcio, no PFCm estivesse reduzida nos animais induzidos ao SE neonatal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A rede neural do comportamento social (RNCS) relatada por Sarah Winans Newman (1999) fundamentou-se em estudos de lesão e de genes de expressão imediata nas regiões cerebrais sensíveis aos esteroides sexuais que regulam diversas formas de expressão do comportamento social (comportamento agressivo, comportamento sexual, vínculo e afiliação, comportamento parental e na resposta ao estresse social). As estruturas apontadas foram o septo lateral (LS), área pré-óptica (POA), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo anterior (AH), a substância cinzenta periaquedutal mesencefálica (PAG), a amígdala medial (meAMG) e o núcleo leito da estria terminal (BNST). Entretanto, faltavam regiões a serem detectadas e avaliadas na RNCS para que fosse possível responder as dúvidas de múltiplas modalidades sensoriais de outros indivíduos do grupo, de maneira que fosse possível analisar os aspectos potencialmente recompensadores das intenções sociais e também que respondesse por comportamentos sociais complexos, como a formação, manutenção e ajuste dinâmico de hierarquias sociais que dependem da capacidade de memorizar informações sobre indivíduos específicos, perceber mudanças no ambiente social, e de se adaptar a elas (CHEN CONNELL e HONG, 2018; ROGERS-CARTER e CHRISTIANSON, 2019). O'CONNELL e HOFFMANN (2011, 2012) observaram que as estruturas cerebrais do sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico expressam vários dos mesmos receptores e genes que mediam os comportamentos sociais que foram analisados para definir o RNCS. Assim, O'CONNELL e HOFFMANN uniram o RNCS com o sistema dopaminérgico mesolímbico e adotaram o termo rede neural de tomada de decisão social (RNTDS), que passou a incluir o núcleo accumbens (NAc), amígdala basolateral (BLA), ventral pálido (VP), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIP) e a área tegumentar ventral (VTA). Não é inesperado que a RNTDS seja complexa, uma vez que a rede detecta, avalia e reage aos estímulos sociais de múltiplas modalidades sensoriais e não sociais, e produz uma resposta comportamental adaptativa perante as

oportunidades e desafios (O'CONNELL e HOFFMANN, 2011, 2012). O conhecimento sobre esta rede ainda é muito limitado, considerando que ela foi reconhecida recentemente, no entanto o córtex pré-frontal foi associado ao controle *top-down* da tomada de decisão social; a amígdala, associada com a modulação do processamento emocional e com processamento dos estímulos sensoriais e, no caso dos roedores, o odor social; o hipotálamo, à resposta ao estresse e integração dos estímulos do meio interno e externo; o hipocampo, o sítio da memória social, da representação de diferentes dimensões do espaço social, de rastreamento do comportamento social dinâmico, da flexibilização do mapa cognitivo social para adaptação a novos contextos sociais e por consequência é também alvo do comportamento social desadaptativo em alguns transtornos psiquiátricos; e o núcleo accumbens associado à recompensa social (TRAINOR e GREENBERG, 2016, KO, 2017, MONTAGRIN, et al., 2018).

O córtex pré-frontal estabelece importante interligação com o hipocampo ventral, amígdala, área tegumentar ventral e núcleo accumbens (BICKS et al., 2015) exercendo papel relevante na cognição social e no controle executivo para organizar e implementar comportamentos sociais adequados ao contexto social exposto (BICKS, et al., 2015, SUN et al., 2020). Recentemente, SUN, et al., (2020) apresentam que a inibição do hipocampo ventral (HIPv) ou as projeções diretas para o córtex pré-frontal medial (mPFC) prejudicam a expressão da memória social, mesmo que, o HIPv se projete para todos os interneurônios GABAérgicos, especialmente aqueles positivos para a parvalbumina (PV+) e que estes sejam recrutados durante a interação social. A interrupção da atividade do HIPv inibe também a atividade dos neurônios PV+, mas a reativação do PV+ restaura a memória social. Esses resultados reforçam as pesquisas convergentes de modelos animais para doenças humanas, sugerindo que alterações no circuito neural do córtex pré-frontal estão relacionadas a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos associados com prejuízos do comportamento social.

O ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC), diminui a excitabilidade neuronal ao aumentar a condutância de íons Cl^- na membrana neuronal. O desequilíbrio da excitação e inibição (E/I) na transmissão sináptica tem sido destacado com uma característica comum nos distúrbios de neurodesenvolvimento, como no transtorno do espectro autista (TEA) (RAMAMOORTHY e LIN, 2011; LE MAGUERESSE e MONYER, 2013). O desequilíbrio E/I pode ser causado pelo aumento da sinalização glutamatérgica ou diminuição da sinalização GABAérgica, que altera a forma como o cérebro processa as informações e regula o comportamento. O desenvolvimento correto dos interneurônios GABAérgicos é fundamental para um equilíbrio da E/I e para integração cognitiva multissensorial e função comportamental exercida pelo córtex pré-frontal (COSSART, 2011; KELSOM e LU, 2013; MAGUERESSE, MONYER, 2013).

Diversas evidências demonstram o envolvimento do sistema GABAérgico no comportamento social. Em camundongos, danos a estes interneurônios nas regiões frontal e parietal durante o período pós-natal produz déficits sociais, aumento da ansiedade e da susceptibilidade às convulsões (LEVITT, 2005). Camundongos machos haplodeficientes para GAD-67, a enzima percussora para síntese do GABA, demonstram redução na sociabilidade, aumento da agressividade e sensibilidade aos odores sociais. Ademais, foi observada redução da imunomarcação para o gene c-fos em regiões cerebrais relacionadas à RNTDS, como septo lateral, área pré-óptica medial, núcleo leito da estria terminal amígdala medial e cortical, sugestivo de prejuízo na detecção e processamentos de evidências sociais relevantes (SANDHU et al., 2014). YIZHAR et al., (2011) demonstram que a ativação de neurônios piramidais no córtex pré-frontal medial (mPFC) aboliu a exploração social, prejudicou as preferências sociais e aumentou a oscilação gama, que foi atenuada pelo aumento do tônus dos interneurônios PV+. A administração de cetamina durante a segunda semana pós-natal diminuiu a expressão da parvalbumina no mPFC, liberação de GABA, reconhecimento social e exploração social (JEEVAKUMAR et al., 2015; JEEVAKUMAR e KROENER, 2016). Esses achados corroboram com estudos em humanos com TEA que demonstram E/I dentro do córtex pré-frontal medido pela diminuição das oscilações gama (BICKS et al., 2015; FERGUSON e GAO, 2018). Ainda, existem evidências convincentes de que um único episódio de SE neonatal pode alterar a sinalização GABAérgica ao nível dos receptores GABA (ZHANG et al., 2004a; ZHANG et al., 2004b; ISAEVA et al., 2006; ISAEVA et al., 2010) favorecendo o desequilíbrio E/I no neocórtex e hipocampo. DA SILVA et al., (2005) relatam que múltiplos episódios de SE em P7, P8 e P9 produziram diversas alterações neocorticais e hipocampais permanentes. Interneurônio PV+ foram difusamente distribuídos entre as camadas corticais nestes animais, em contrapartida, nos controles eles foram localizados principalmente nas camadas corticais II, V e VI; a imunomarcação de interneurônios GABAérgicos positivos para calbidina (CB+) diminuiu e o GAD-65 aumentou no neocórtex e no hipocampo. Com fundamento nesses dados, suspeitou-se que também exista uma alteração permanente dos interneurônios GABAérgicos no córtex pré-frontal de animais submetidos ao SE em período neonatal.

O hipocampo exerce papel central na memória episódica e na orientação espacial, sendo a estrutura espaço-temporal dentro do qual os vários componentes sensoriais, cognitivos e emocionais estão interligados para contextualizar a experiência (KNIERIM et al., 2015). A memória episódica inclui vários componentes como informações de lugares (onde), temporais (quando), sociais (quem) e eventos (quando) (OKUYAMA, 2018). Não é inesperado que prejuízo de sociabilidade tenha sido relatado em pacientes com epilepsia do lobo temporal, mesmo sem diagnóstico de autismo (WANG et al., 2015; IVES-DELIPERI e JOKEIT, 2019),

em ratos com lesão hipocampal (MAASWINKEL et al., (1996)) e em ratos com epilepsia do lobo temporal (MARIN et al., 2008).

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Presbiteriana Mackenzie e realizado no laboratório de Neurobiologia e Metabolismo Energético. Os ratos Wistar recém-nascidos foram mantidos com suas mães em estantes ventiladas (ALESCO, Brasil) sob condições reguladas (ciclo claro/escuro 07:00 – 19:00 horas; 22-24°C; umidade relativa de 50-55%), com livre acesso a água e comida. Suas idades foram determinadas a partir do dia do nascimento (P0). Os animais foram sexados em P5 e somente foram utilizados os filhotes machos.

3.2 Indução do *Status Epilepticus* (SE) neonatal

Como em estudos anteriores (CASTELHANO et al., 2010, 2013, 2015, PACÍFICO et al., 2020 e RIBEIRO et al., 2020), para induzir o SE fora utilizada a pilocarpina, de maneira que os ratos Wistar machos no P9 receberam pilocarpina (Sigma) 3,8% em solução salina (380 mg / kg, i.p) ou solução salina (0,1 mL / 10g). Neste período, os animais estiveram sob uma fonte luminosa para se manterem aquecidos. A taxa de mortalidade desta etapa foi de aproximadamente 10%. Após a finalização do SE, os animais retornaram as suas respectivas caixas moradias até serem desmamados no 21º dia pós-natal e agrupados 3-5 animais por caixa para formar os seguintes grupos (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais nos grupos. CTR = grupo controle, EXP = grupo experimental, CTRBL = controle basal, entre parênteses número de animais por grupo.

GRUPOS	CTR (5)	CTR – Exposição à novidade social (5 animais)
	EXP (5)	EXP – Exposição à novidade social (5 animais)
	CTRBL (5)	Permaneceram nas caixas moradias

Fonte: De autoria própria

O grupo CTRBL não recebeu quaisquer estímulos e foi referência da ativação basal do gene c-fos. O c-fos é um proto-oncogene de ativação imediata, cujo produto proteico (proteína c-fos) é usado como marcador de ativação neural que pode ser identificado por técnicas imuno-histoquímicas (Bullitt, E, 1990).

3.3 Testes comportamentais

Os testes ocorreram em ratos (PN 60-70) habituados previamente (45 minutos) à sala de experimentação com pouca iluminação, entre 8:00-12:00 horas, sem a presença do experimentador e filmados para análise posterior.

3.3.1 Teste de sociabilidade

Animais (CTR e EXP) habituados a uma arena circular (50cm (altura) x 60cm (diâmetro)) contendo uma caixa de acrílico (L x P x A, 40cm x 40cm x 40cm) durante 3 dias por 10 minutos, foram expostos, a um estímulo social não familiar em um contexto familiar. O estímulo social foi um co-específico não-familiar do mesmo sexo (30-35 dias pós-natal) inserido dentro da caixa de acrílico por 10 minutos. A atividade locomotora foi avaliada durante os primeiros 10 minutos da habituação e durante a exposição ao estímulo social. A investigação social foi avaliada durante o tempo de exposição ao co-específico. Ao final, os animais foram anestesiados e perfundidos 1,5 hora do término do experimento.

3.4 Perfusão transcardíaca

Os ratos anestesiados profundamente com Uretana (1,2g/kg) foram perfundidos com tampão PBS (0,1M, pH 7,4) seguido de PFA 4%, com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S, 15 ml/min), por meio de uma agulha (40X12) inserida no ventrículo esquerdo. Os ratos foram decapitados e os encéfalos removidos. Os encéfalos permaneceram por 24 horas em PFA 4% e posteriormente em solução de sacarose 30% por 72 horas. Em seguida, foram obtidos cortes coronais seccionados na espessura de 40µm com vibratomo de lâmina vibratória (Leica System) referentes as seguintes regiões de acordo com o atlas córtex pré-frontal (4,68mm a 2,76mm) (Paxinos e Watson, 6th edition, 2009, versão compacta).

3.5 Imunofluorescência

As fatias (4/6 por região de interesse por animal) lavadas com PBS 0,1M (3x por 10 minutos) foram colocadas em tampão bloqueio (10% de soro de cabra, 5% de albumina de soro bovina e 0,2% Triton X-100 em PBS 0,1M) por 1 hora. Posteriormente, foram incubadas "overnight" a 4°C com o anticorpo primário monoclonal anti-C-fos (1:1000) e policlonais anti-somatostatina (1:100) em solução de 5% de soro de cabra, 1% de BSA em PBS 0,1M contendo 0,2% de triton X-100. Após o período de incubação as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Texas Red, 1:500) e (Goat anti-rabbit Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, 1:500) por 2 horas à temperatura ambiente em solução de 5% de soro de cabra, 1% de BSA em PBS 0,1M contendo 0,2% de triton X-100. Em seguida, as fatias foram lavadas 2

vezes com PBS e depois na presença de DAPI (1:10.000). As fatias foram montadas em lâminas de vidro com fluoromount-G, fotografadas e as imagens analisadas no imageJ.

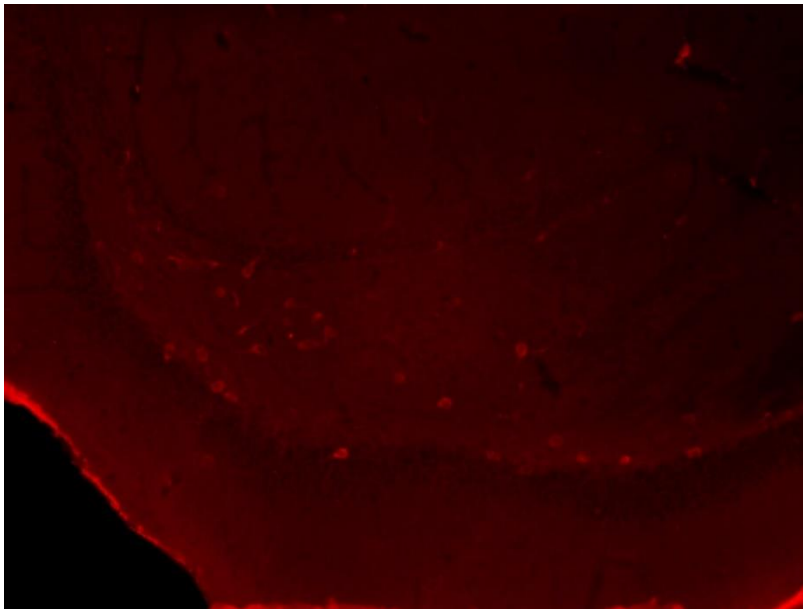
4. RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise das imagens das lâminas de imunomarcação dos interneurônios GABAérgicos na região do córtex pré-frontal, realizada no imageJ, demonstrou uma ausência de marcação expressiva para os anticorpos c-fos e somatostatina nessa região. Essa falta de marcação pode ter significativas implicações, sugerindo um comprometimento na cognição e tomada de decisão sociais, e no controle para estruturar e aplicar o comportamento social adequado ao contexto social apresentado, mas sem haver alterações na capacidade de memória de trabalhos, conforme discutido na literatura. No entanto, é importante levar em conta que a ausência de marcação pode ser relacionada às baixas concentrações utilizadas dos anticorpos para imunomarcação, ou ainda em relação aos roedores usados, uma vez que a maioria das análises de imunomarcação do córtex pré-frontal foi realizada em camundongos e não em ratos.

Paralelamente a esse projeto, outras pesquisas foram realizadas em relação a análise de outras áreas que compõe a rede neural de tomada de decisão social (RNTDS), como hipocampo. Nessas análises, observou-se que a imunomarcação destacou principalmente as fibras nervosas com o anticorpo c-fos, com menor ênfase na marcação do núcleo dos interneurônios nas regiões hipocampais.

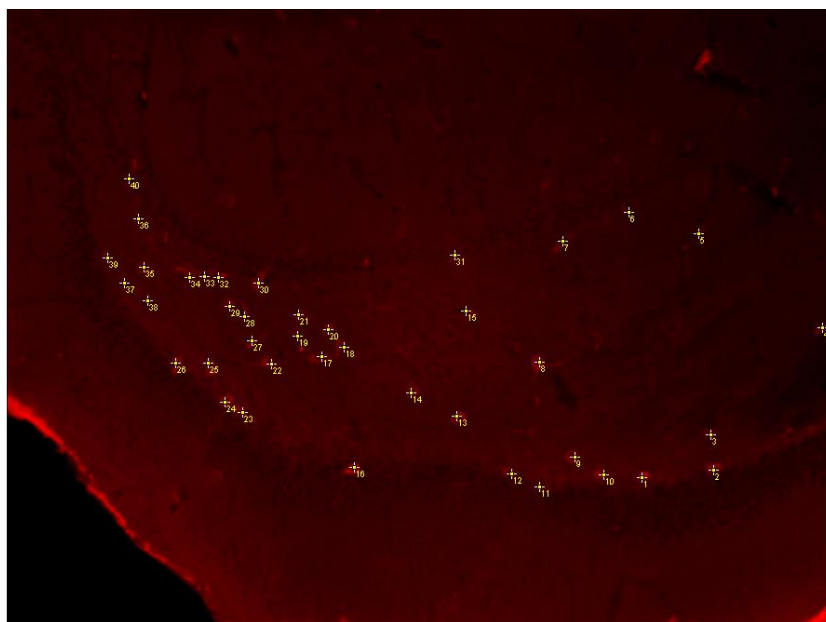
Além disso, é relevante notar que o grupo controle (CTR), que recebeu administração de salina, apresentou uma marcação mais intensa do anticorpo somatostatina. Nas fotografias das regiões hipocampais fica evidente uma diminuição na quantidade de interneurônios no grupo experimental (EXP), no qual o *status epilepticus* foi induzido através do uso de pilocarpina. Em contrapartida, o grupo controle exibiu uma maior quantidade de interneurônios.

FOTOGRAFIA 1 – Corte coronal do encéfalo referente a região do hipocampo de um animal do grupo controle, em que pode ser observado a imunomarcção de um número maior de interneurônios, na porção interior da camada granular. (Modelo de microscópio Zeiss Imager M1, objetiva 10x)



Fonte: De autoria própria

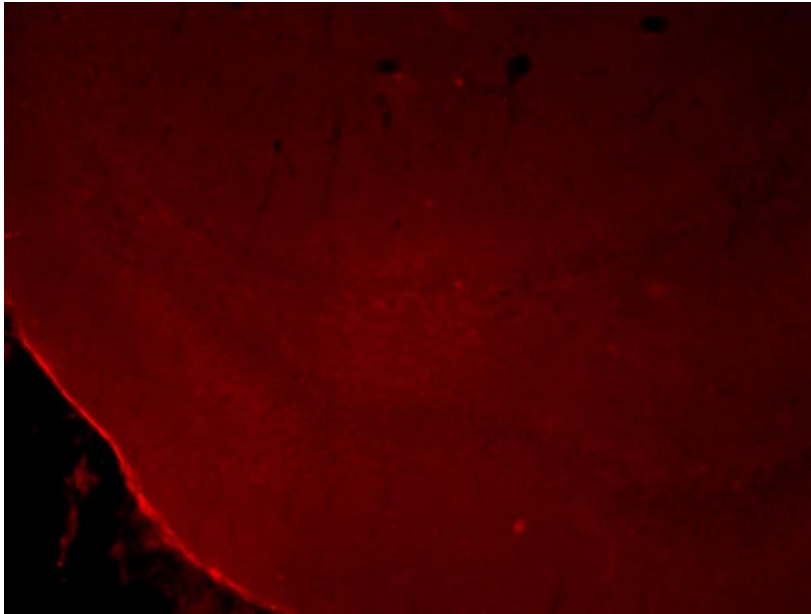
FOTOGRAFIA 2 – Na seguinte imagem é indicado a contagem de interneurônios presentes na região interior da camada granular do hipocampo, indicando a presença de 40 interneurônios através da imunomarcção com anticorpo somatostatina. (Microscópio Zeiss Imager M1, objetiva 10x).



Fonte: De autoria própria

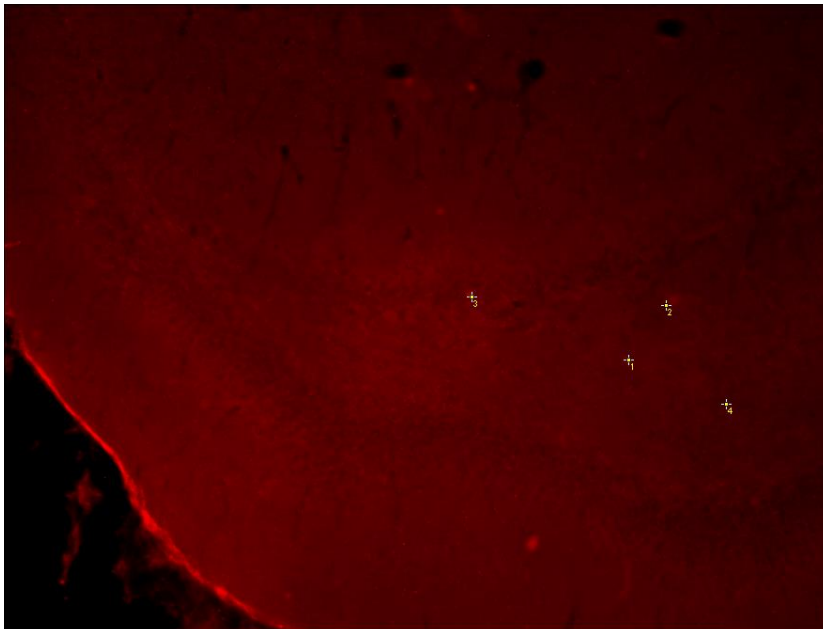
FOTOGRAFIA 3 – Corte coronal do encéfalo referente a região do hipocampo de um animal do grupo experimental, em que pode ser observado a imunomarcção de um número

menor de interneurônios, na porção interior da camada granular. (Microscópio Zeiss Imager M1, objetiva 10x).



Fonte: De autoria própria

FOTOGRAFIA 4 - Na seguinte imagem é indicado a contagem de interneurônios presentes na região interior da camada granular do hipocampo, indicando a presença de 4 interneurônios através da imunomarcacão com anticorpo somatostatina. (Microscópio Zeiss Imager M1, objetiva 10x).



Fonte: De autoria própria

Esses resultados indicam que a indução do SE neonatal pode influenciar de forma negativa a rede neural de tomada decisão social (RNTDS) comprometendo possivelmente as relações sociais. A menor quantidade de interneurônios observada no grupo experimental sugere uma possível relação entre a indução do SE e a alteração na quantidade de

interneurônios, o que diminui seu contato sináptico com as células piramidais da região CA3, resultando em complicações na função neural e do comportamento social.

Essas observações reforçam a complexidade da interação entre a atividade epilética e a função neural em contextos sociais. Entretanto, é necessária ressaltar que em pesquisas futuras deverão ser feitas com concentrações aprimoradas de anticorpos para se obter uma compreensão mais detalhada desses efeitos e suas implicações na região do córtex pré-frontal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, embora a imunomarcagem dos interneurônios GABAérgicos na região do córtex pré-frontal não tenha sido conclusiva, foi possível estabelecer uma relação entre o *status epilepticus* (SE) e outras regiões que são parte da rede neural de tomada de decisão social (RNTDS). Essa relação é evidenciada pela análise da diminuição neuronal em áreas específicas, o que pode ter um impacto negativo nas relações sociais de indivíduos afetados por doenças neurodegenerativas. Essa descoberta destaca a importância de compreender as implicações da atividade epilética em diferentes regiões cerebrais, a fim de proporcionar questões valiosas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para esses distúrbios neurológicos complexos.

6. REFERÊNCIAS

- Barbosa GHL, Batista SP, Dos Santos PB, Thomaz CRC, Scorza FA, Cysneiros RM. **Single neonatal status epilepticus does not impair cognitive function in rats.** *Epilepsy Behav.* 2017; 72:200-202. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.04.031.
- Bernard PB, Benke TA (2015). **Early life seizures: evidence for chronic deficits linked to autismo and intellectual disability across species and models.** *Exp Neurol* 263:72-78.
- Bernard PB, Castano AM, Beitzel CS, Carlson VB, Benke TA (2015). **Behavioral changes following a single episode of early-life seizures support the latent development of an autistic phenotype.** *Epilepsy Behav* 44:78-85.
- Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H. **Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man.** *Front Psychol.* 2015 Nov 26;6:1805. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01805.
- Castelhano AS, Cassane Gdos S, Scorza FA, Cysneiros RM. **Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures.** *Front Behav Neurosci.* 2013 ;7:36. doi:10.3389/fnbeh.2013.00036.
- Castelhano AS, Ramos FO, Scorza FA, Cysneiros RM. **Early life seizures in female rats lead to anxiety-related behavior and abnormal social behavior characterized by reduced**

motivation to novelty and deficit in social discrimination. J Neural Transm (Vienna). 2015; 122(3):349-55. doi:10.1007/s00702-014-1291-2.

Castelhano AS, Scorza FA, Teixeira MC, Arida RM, Cavalheiro EA, Cysneiros RM. **Social play impairment following status epilepticus during early development.** J Neural Transm (Vienna). 2010 ;117(10):1155-60. doi: 10.1007/s00702-010-0460-1

da Silva AV, Regondi, TC, Cavalheiro, EA, Spreafico R (2005). **Disruption of cortical development as a consequence of repetitive pilocarpine-induced status epilepticus in rats.** Epilepsia 46:22-30

Hodges, S., Reynolds, C., Nolan, S., Huebschman, J., Okoh, J., Binder, M., Lugo, J. (2019). **A single early-life seizure results in long-term behavioral changes in the adult Fmr1 knockout mouse.** Epilepsy Research, 157, 106193. doi:10.1016/j.epilepsyres.2019.106193

Ives-Deliperi, V., Jokeit, H (2019). **Impaired social cognition in epilepsy: a review of what we have learnt from neuroimaging studies.** Frontiers in Neurology,10:940. 2019 doi:10.3389/fneur.2019.00940

Kelsom C, Lu W. **Development and specification of GABAergic cortical interneurons.** Cell Biosci. 2013 Apr 23;3(1):19. doi: 10.1186/2045-3701-3-19.

Ko, J. (2017). **Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns.** Frontiers in Neural Circuits, 11.doi:10.3389/fncir.2017.00041

Le Magueresse C, Monyer H (2013). **GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex.** Neuron 77:388-405.

Levitt P. **Disruption of interneuron development.** Epilepsia. 2005;46 Suppl 7:22-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00305.x.

Lin YT, Hsieh TY, Tsai TC, Chen CC, Huang CC, Hsu KS. **Conditional Deletion of Hippocampal CA2/CA3a Oxytocin Receptors Impairs the Persistence of Long-Term Social Recognition Memory in Mice.** J Neurosci. 2018 ;38(5):1218-1231. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1896-17.2017.

Lugo JN, Swann JW, Anderson AE (2014). **Early-life seizures result in deficits in social behavior and learning.** Exp Neurol 256:74-80.

Maaswinkel, H., Baars, A., Gispen, W., Spruijt, B. (1996). **Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats.** Physiology & Behavior, 60(1), 55–63. doi:10.1016/0031-9384(95)02233-3

Marin, J., Moura, P., Cysneiros, R, et al. **Temporal lobe epilepsy and social behavior: an animal model for autism?**. *Epilepsy Behav.* 2008;13(1):43-46. doi:10.1016/j.yebeh.2008.03.004

Montagrin A, Saiote C, Schiller D. **The social hippocampus**. *Hippocampus*. 2018 Sep;28(9):672-679. doi: 10.1002/hipo.22797.

O'Connell LA, Hofmann HA. **The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis**. *J Comp Neurol*. 2011 ;519(18):3599-639. doi: 10.1002/cne.22735.

O'Connell LA, Hofmann HA. **Evolution of a vertebrate social decision-making network**. *Science*. 2012;336(6085):1154-7. doi: 10.1126/science.1218889

Pacífico AM, Batista SP, Ribeiro FT, Santos PBD, Silveira GB, Pedrico do Nascimento BP, Junior ED, Barbosa GHL, Ribeiro MO, da Silva SG, Cysneiros RM. **Dataset on sociability, cognitive function, gene and protein expression of molecules involved in social behavior, reward system and synapse function following early-life status epilepticus in Wistar rats**. *Data Brief*. 2020 ;31:105819. doi: 10.1016/j.dib.2020.105819.

Reynolds CD, Nolan SO, Huebschman JL, Hodges SL, Lugo JN (2017). **Early-life status epilepticus acutely impacts select quantitative and qualitative features of neonatal vocalization behavior: Spectrographic and temporal characterizations in C57BL/6 mice**. *Epilepsy & Behavior* 72:58-62.

Reynolds CD, Smith G, Jefferson T, Lugo JN (2016). **The effect of early life status epilepticus on ultrasonic vocalizations in mice**. *Epilepsia* 57:1377-1385.

Ramamoorthi K, Lin YX (2011). **The contribution of GABAergic dysfunction to neurodevelopmental disorders**. *Trends in Molecular Medicine* 17:452-462.

Sandhu KV, Lang D, Muller B, Nullmeier S, Yanagawa Y, Schwegler H, Stork O (2014) **Glutamic acid decarboxylase 67 haploinsufficiency impairs social behavior in mice**. *Genes Brain and Behavior* 13:439-450.

Sun Q, Li X, Li A, Zhang J, Ding Z, Gong H, Luo Q. **Ventral Hippocampal-Prefrontal Interaction Affects Social Behavior via Parvalbumin Positive Neurons in the Medial Prefrontal Cortex**. *iScience*. 2020 Mar 27;23(3):100894. doi: 10.1016/j.isci.2020.100894.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH. **A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus**. *Epilepsia*. 2015 Oct;56(10):1515-23.

Wei, D., Lee, D., Cox, C. D., Karsten, C. A., Peñagarikano, O., Geschwind, D. H., Piomelli, D. (2015). **Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(45), 14084–14089. doi:10.1073/pnas.1509795112

Xiu-Yu, S., Ruo-Peng, S., Ji-Wen, W. (2007). **Consequences of pilocarpine-induced recurrent seizures in neonatal rats. Brain & Development**, 29(3):157-163.doi:10.1016/j.braindev.2006.08.009.

Contatos: julia.souza1608@gmail.com e roberta.cysneiros@mackenzie.br