

**FACULDADE DE MEDICINA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**FERNANDA NOAL CARLESSO**

**AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO NA  
ATIVIDADE EPILEPTIFORME NÃO-  
SINÁPTICA**

**Porto Alegre  
2008**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS**

**FERNANDA NOAL CARLESSO**

**AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO NA ATIVIDADE EPILEPTIFORME NÃO-  
SINÁPTICA**

**Porto Alegre  
2008**

**FERNANDA NOAL CARLESSO**

**AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO NA ATIVIDADE EPILEPTIFORME NÃO-SINÁPTICA**

**Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.**

**Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida**

**Porto Alegre**  
**2008**

**FERNANDA NOAL CARLESSO**

**AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO NA ATIVIDADE EPILEPTIFORME NÃO-SINÁPTICA**

**Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.**

**Aprovada em 03 de março de 2008**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Magda Lahorgue Nunes**

---

**Prof. Dr. Cristina Maria Moriguchi Jeckel**

---

**Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin**

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C278a Carlesso, Fernanda Noal

Ação do brometo de sódio na atividade epileptiforme não-sináptica/ Fernanda Noal Carlesso. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

100 f.: gráf. il. tab.

Orientação: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Co-Orientação: Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

1. BROMETOS/farmacologia. 2. EPILEPSIA/terapia. 3. IN VITRO. 4. ANTICONVULSIVOS/uso terapêutico. 5. SINAPSES ELÉTRICAS/efeito de drogas. 6. MODELOS MATEMÁTICOS. 7. RATOS WISTAR. 8. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Almeida, Antônio-Carlos Guimarães de. III. Título.

C.D.D. 618.853

C.D.U. 616.853:661.32(043.2)

N.L.M. WL 385

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante o mestrado.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, que contribuiu para a realização deste trabalho com muita competência, mostrando muita confiança e incentivo para realizar parte de meu trabalho em Minas Gerais.

Ao meu co- orientador Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães pela dedicação, apoio e oportunidade para desenvolver meu trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Antônio Márcio e também aos outros professores do laboratório de São João Del Rei, por sempre se mostrarem à disposição para ajudar.

Ao Prof. Dr Mário Antônio Duarte e sua família, por todo carinho, amizade, apoio, incentivo e pela acolhida.

Ao Prof. Dr Martín Cammarota, por passar espírito crítico e observador, ajudando-me na escrita do artigo.

A todo grupo do Laboratório de Neurociência Computacional e Experimental pelo apoio e acolhimento durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todo grupo do Laboratório de Neurociências pelo apoio, amizade e carinho.

A querida Gianina, pela amizade e por me ajudar na escrita do artigo.

Aos amigos Jociane e Mauro, pela amizade e por sempre estarem me ajudando na realização deste trabalho.

Às secretárias Nelcy Arndt, Thais Carneiro, Sônia Mantova, Simone Nascimento, pela disposição em sempre me ajudar.

Aos amigos, que sempre estiveram comigo me apoiando e participando na realização deste trabalho.

## RESUMO

**Justificativa:** Apesar do brometo ter sido a primeira terapêutica para o tratamento das epilepsias refratárias em crianças, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente esclarecido. O mecanismo de ação proposto, sugere ação GABAérgica. Entretanto, apesar de compartilhar a cinética iônica com os cloretos sua atividade na membrana neuronal independente da atividade sináptica não foi estudada. **Objetivos:** Este estudo tem como objetivo verificar o efeito do NaBr sobre as atividades epileptiformes (AE), induzidas por supressão das conexões não-sinápticas por perfusão com líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) 0-  $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$ . **Métodos e Resultados:** O estudo envolveu medidas experimentais e simulação. Os experimentos com grupo NaBr (n=23), grupo SITS (n=3), grupo controle (n=3) foram realizados em fatias de hipocampo de ratos *Wistar* (4 a 6 semanas). Após indução das atividades epileptiformes por perfusão com ACSF 0-  $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$  (8 mM), o  $\text{Br}^-$  foi aplicado por substituição nas seguintes concentrações: 5, 7, 9 e 11 mM de NaCl por 5, 7, 9 e 11 mM de NaBr. O SITS também foi aplicado por perfusão (tempo: 20min). A aplicação do  $\text{Br}^-$  resultou na supressão reversível das AE do giro denteado (GD). Antes da completa supressão das AE, foram observadas as seguintes alterações no potencial elétrico extracelular (PE): (i) redução da amplitude da componente DC; (ii) aumento transitório das amplitudes dos *population spikes*, seguido de redução até completa supressão; (iii) reduções da duração e intervalo entre eventos. Simultâneo ao potencial elétrico extracelular foi registrado o sinal óptico intrínseco (IOS). Em termos temporais, da mesma forma que o PE, observaram-se reduções da duração e do intervalo entre eventos. Espacialmente, o IOS sugere uma partição da região que compreende os eventos, sugerindo uma redução do recrutamento espacial. As simulações basearam-se na modelagem matemática de mecanismos subcelulares e eletroquímicos de neurônios (bombas de sódio-potássio, canais iônicos, gap-junctions, co-transportes, eletrodifusão, efeito de campo elétrico e variação de volume), compreendendo uma rede de células granulares e gliais interligada a uma rede extracelular. A reprodução do comportamento espaço-temporal durante o bloqueio foi possível supondo-se o efeito competitivo entre o  $\text{Br}^-$  e o  $\text{Cl}^-$ , tanto em canais como em co-transportes. **Conclusões:** 9 mM de NaBr é a concentração mínima necessária para o completo bloqueio das atividades, com tempo mínimo de extinção; Simulações computacionais sugerem duas explicações para o efeito inibitório do NaBr sobre as AE's: (i) atuação competitiva do  $\text{Br}^-$  com o  $\text{Cl}^-$ , decrementando a permeabilidade deste íon que, por sua vez,

reduz seus efluxo e influxo durante os períodos interictal e ictal, respectivamente; (ii) o potencial de Nernst do  $\text{Br}^-$  que tem efeito inibitório, favorecendo a redução da excitabilidade. Possível envolvimento dos canais de  $\text{Cl}^-$  voltagem-dependentes (semelhança dos registros do PE e sinal óptico intrínseco entre NaBr e SITS).

**Palavras-chave:** brometo de sódio, epilepsia, canal de cloro voltagem-dependente, SITS, atividade epileptiforme não- sináptica.

## ABSTRACT

**Rationale:** Bromide was the first therapeutic option in the treatment of refractory pediatric epilepsies. Despite this fact the pharmacological activity of bromides has not been profusely investigated and remains without a complete elucidation. The mechanism of action proposed suggests GABAergic activation. Bromides share ionic kinetics with chlorides. However, its activity on nonsynaptic mechanisms has not been studied yet. **Purpose:** This study aims to verify the effect of NaBr on epileptiform activity (EA) induced by suppression of nonsynaptic connections through perfusion with 0-  $\text{Ca}^{++}$  and high  $\text{K}^{+}$  artificial cerebrospinal fluid (ACSF).

**Methods and Results:** The study involved experimental measures and simulation. Experiments were taken on hippocampal slices from Wistar rats (4 to 6 weeks old). The studied groups were NaBr (n=23), SITS (n=3), and control (n=3). After EA induction with 0-  $\text{Ca}^{++}$  and high  $\text{K}^{+}$  (8 mM) ACSF,  $\text{Br}^{-}$  was applied by perfusion. We replaced chloride for bromide in the following concentrations: NaCl 5, 7, 9 and 11 mM for NaBr 5, 7, 9 and 11 mM. SITS was also perfused (time: 20min).  $\text{Br}^{-}$  reversely suppressed EA in the dentate gyrus (DG). Before full EA suppression, we observed the following changes in the extracellular field potentials (FP): (i) decrease of DC amplitude; (ii) transitory increase of population spikes amplitudes, followed by reduction until full suppression; (iii) decrease of event duration and inter-event interval. Simultaneously, we recorded the intrinsic optical signal (IOS). In accordance to FP recordings we observed decrease of event duration and inter-event interval. SITS response was similar to the NaBr one. IOS suggests partition in the region comprehending the events, pointing a reduction in spatial recruitment with NaBr. Simulations were based on mathematical modeling of subcellular and electrochemical mechanisms of neurons (sodium-potassium pump, ion channels, gap junctions, co-transporters, electrodiffusion, field effect and volume variation), comprehending a net of granular and glial cells connected to extracellular net. Reproduction of space-time behavior during blockade was possible with the assumption of competitive effect between  $\text{Br}^{-}$  and  $\text{Cl}^{-}$ , either in channels or cotransports.

**Conclusion:** NaBr at 9 mM is the minimum required concentration for full blockade of EA, with minimum extinction time. Computational simulations suggest two explanations for the inhibitory effect of NaBr on EA: (i)  $\text{Br}^{-}$  competing with  $\text{Cl}^{-}$ , decreasing permeability of the

latter, which reduces efflux and influx during interictal and ictal periods, respectively; (ii)  $\text{Br}^-$  Nernst potential, that has inhibitory effects, favoring reduction in excitability. Possible involvement of voltage-dependent  $\text{Cl}^-$  channels (FP and IOS recordings similar for NaBr and SITS).

**Key-words:** sodium bromide, epilepsy, voltage-dependent chloride channel canal, SITS, nonsynaptic epileptiform activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ilustração da anatomia do hipocampo (retirado de Pirttilä, 2006). A- Hipocampo humano; B- Fotomiografia digital ilustrando hipocampo humano; C- Hipocampo de rato com suas sub-regiões e camadas; D- Fotomiografia digital ilustrando hipocampo de rato. Abreviações: s.o, stratum oriens; s.p, stratum piramidales; s.r, stratum radiatum; s.lm, stratum molecular-lacunoso; Sb, subiculum; m, camada molecular; h, hilus; g, camada granular do giro denteado. Escala das barras: B- 1mm; D- 500  $\mu$ m. .... 28
- Figura 2 – Desenho esquemático de um corte transversal do hipocampo mostrando as três sub-regiões do giro denteado. A região do ápice, que corresponde ao ponto de transição entre as lâminas supra-piramidal, que é a região mais próxima da região CA1, e infra-piramidal (modificado de MARTIN *et al.*, 2002). .... 29
- Figura 3 – Hipocampo de rato e suas regiões (modificado de PAN e STRINGER, 1996). Em A- Representação esquemática da fatia de hipocampo mostrando as três regiões básicas. B- Desenho esquemático, modificado de O'MARA *et al.* (2001), de uma seção horizontal através da formação hipocampal indicando várias regiões (corno Ammon, complexo subicular e giro denteado) e camadas (ca, camada *alveus*; co, camada *oriens*; cp, camada piramidal; sr, *stratum radiatum*; cml, camada molecular - lacunosa; H, hilus; CG, camada granular; CM, camada molecular e camadas I, II, III, IV, V e VI presentes no complexo subicular). O complexo subicular é composto pelos subículo (S), pré-subículo (PrS), pára-subículo (PaS). CE representa o córtex entorrinal e fi a fímbria hipocampal. .... 29
- Figura 4 – Registro de eventos epileptiformes não-sinápticos (salva de espículas formadas por potenciais de ação síncronos, denominadas *population spikes*, após um deslocamento negativo da linha de base) característicos das regiões do hipocampo, após perfusão com solução sem  $Ca^{++}$  e com alta  $[K^+]$ . Na região CA1, eventos epileptiformes, os *bursts* apresentam PS'S com grandes amplitudes, na região CA3, os PS'S ocorrem de forma mais estável e com menor intervalo de tempo entre os eventos. E no GD, há atividade neuronal intensa, com descargas em salva prolongadas e com variação negativa da linha de base seguido de PS'S de grandes amplitudes (retirado de DUDEK *et al.*, 1993). .... 32
- Figura 5 – Descargas em salva (DS) características da região do giro denteado. Em A- Descarga em salva (*burst*) avaliado durante as atividades epileptiformes induzidas através do protocolo experimental alto- $K^+$  (8 mM) e zero- $Ca^{++}$  adicionado. DS é caracterizado por um deslocamento negativo e lento do potencial extracelular, em nível DC, simultâneo com a ocorrência de uma seqüência de atividades de alta freqüência, os PS's. Em B exemplo de uma seqüência de descarga em salva..... 33
- Figura 6 – Estrutura tridimensional do modelo para representar o tecido banhado pela solução de perfusão (retirado de RODRIGUES, 2003). .... 34
- Figura 7 – A - Representação esquemática dos mecanismos transmembrânicos de transporte iônico para neurônios. B - Glia (retirado de RODRIGUES, 2003). .... 34
- Figura 8 – Exemplo típico de um experimento com aplicação de brometo. A linha vermelha indica o tempo para o NaBr chegar a fatia e a linha em azul o seu tempo de atuação. .... 43
- Figura 9 – Esquema do procedimento realizado para a retirada do encéfalo da cavidade craniana. A) abertura do escalpo; B) corte mediano e lateral na calota craniana;

- C) remoção das partes superiores da calota craniana; D) retirada do encéfalo da cavidade craniana; E) remoção do mesmo para uma solução nutritiva. .... 44
- Figura 10 – Isolamento do hipocampo do restante do cérebro de rato. Nas fotos A, B, C, D e E, os cortes feitos para facilitar a dissecação. Em F é mostrado um detalhe da separação do tálamo, com ajuda de micro-espátulas. Em G, H e I, o hipocampo foi isolado do restante do córtex (retirado de CARVALHO, 2003). .... 45
- Figura 11 – Fatiador do tipo “*Mcllwain tissue slicer*” (vista superior). Os hipocampos foram posicionados na mesa móvel formando ângulos de 70° entre a lâmina presa a uma extremidade da haste (linhas tracejadas) e a fímbria do hipocampo. Em cada corte, o parafuso micrométrico foi girado para um avanço de 400 µm. .... 46
- Figura 12 – Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com ACSF normal, mantida a temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon. .... 48
- Figura 13 – Câmara de interface. Sendo, à esquerda, vista superior mostrando em detalhe a constituição da cuba. Em 1, está o local onde as fatias foram depositadas; em 2, o recipiente por onde é controlado o nível da solução de banho das fatias; em 3, o termômetro responsável pelo controle da temperatura da solução de banho das fatias; e, em 4, os orifícios por onde chegam o oxigênio na câmara. E, à direita, a vista lateral mostrando o banho-maria. Em 5, são mostradas duas das quatro resistências envolvidas em invólucros de vidro; em 6, o tubo enrolado no cilindro central por onde passa a solução de banho aquecida; em 7, o local por onde o carbogênio chega na câmara; e em 8, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara. .... 49
- Figura 14 – Equipamentos utilizados para obtenção do registro simultâneo do PE e do IOS durante as AE em fatias do hipocampo. 1- Amplificador CYBERAMP 380 para amplificação do sinal elétrico; 2- “Setup” para registro do potencial elétrico extracelular; 3- Pré-amplificador (Headstage modelo AI 402 x 50) para aquisição dos sinais e foi interligada a um amplificador biológico; 4- Microscópio estereoscópico (modelo NIKON – SMZ 1500) para visualização das fatias e obtenção do IOS; 5- Imagem do sinal óptico intrínseco obtida na tela do microcomputador através do programa Matlab 6.5 (Imagem VET\_online). .... 52
- Figura 15 – Procedimento para a obtenção dos parâmetros do potencial elétrico extracelular. As siglas IE, DE, DC e PS representam o intervalo entre eventos, a duração dos eventos, a componente DC ,PS’s, respectivamente. .... 54
- Figura 16 – Esquema do procedimento utilizado para obter a imagem espaço-temporal (imagem VET) durante as atividades epileptiformes na camada granular do GD. A- imagem de uma fatia do hipocampo onde é mostrada uma poligonal (curva branca) traçada sobre a camada granular do giro denteado. B- diagrama esquemático da ampliação do giro denteado que representa o conjunto de pixels (quadrados pequenos) que formam a imagem. Os pixels em branco correspondem aos pixels da poligonal da parte A. Os pixels em cinza escuro constituem a região quadrada que foi utilizada para calcular as intensidades médias dos pixels varrendo toda a poligonal. Essa região quadrada é sempre centrada em cada pixels da poligonal (por exemplo, pixel em preto). A partir de cada imagem correspondente a cada instante de tempo, foi construída uma coluna, utilizada para a construção da imagem VET, possuindo as intensidades médias de luz ao longo de toda a camada granular. O mesmo procedimento é utilizado para a poligonal em qualquer outra camada da fatia. .... 55

Figura 17 – Gráficos dos parâmetros (DC, DE, IE e PS) dos registros controles analisados durante 120 minutos (60 à 180 minutos).....	56
Figura 18 – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.....	57
Figura 19 – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 7mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.....	58
Figura 20 – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 5 semanas submetido ao NaBr 9 mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.....	58
Figura 21 – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 5 semanas submetido ao NaBr 11 mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.....	59
Figura 22 – Gráfico referente aos valores da componente DC (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DC normalizada. Observou-se queda de DC em relação ao basal em 4 concentrações empregadas (5, 7 ,9 e 11mM), valor mínimo em 14 minutos concentração de 9 e 11mM e aos 18min as concentrações de 5 e 7 mM.....	60
Figura 23 – Gráfico referente aos valores do PS (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente PS normalizada. Observou-se queda de PS em relação ao basal em 4 concentrações empregadas (5, 7 ,9 e 11mM), valor mínimo em 16 minutos para a concentração de 9mM, 18min para a concentração de 11mM e 23 min para a concentração de 7 mM. Não houve alteração significativa com 5mM.....	60
Figura 24 – Gráfico referente aos valores da DE (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DE normalizada. Observou-se queda da DE em relação ao basal nas 4 concentrações empregadas (5, 7, 9 e 11mM) aos 14 minutos para todas as concentrações.....	61
Figura 25 – Gráfico referente aos valores do IE (%) em relação ao t basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada. Observou-se queda de IE em relação ao basal nas 4 concentrações empregadas (5, 7 ,9 e 11mM), chegando ao valor mínimo em 13 minutos para todas as concentrações.....	61
Figura 26 – Gráfico da relação concentração-resposta (redução ou supressão das AE's pelo NaBr 5, 7, 9 e 11mM). Cada ponto representando a média dos registros extracelulares do potencial elétrico de cada concentração e a média dos tempos destes registros. Este gráfico mostra que na concentração de 7mM se tem um bloqueio das AE em quatro registros (n=6), 9mM é a concentração suficiente para a supressão das AE (n=6) e com 11mM existe uma saturação da resposta (n=6). .....	64
Figura 27 – Gráfico do SITS referente aos valores do DE (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DE normalizada. ....	65

- Figura 28 – Gráfico do SITS referente aos valores do IE(%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada. .... 65
- Figura 29 – Gráfico do SITS referente aos valores do PS (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada. .... 66
- Figura 30 – Gráfico do SITS referente aos valores do DC (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DC normalizada. .... 66
- Figura 31 – A - Localização do eletrodo(e) na camada granular no ápice (A) do giro denteado. Para localizar a região do GD em AE foi traçada uma poligonal no GD ; B - Exemplo de uma imagem da variação espaço temporal das AE durante a aplicação de NaBr 9mM. Simultaneamente foi registrado o potencial elétrico extracelular. Durante a exposição ao fármaco, há um recrutamento espacial neuronal, pois a região de variação do IOS diminuiu. .... 68
- Figura 32 – Gráficos do brometo de sódio representando os eventos (*bursts*) analisados das imagens do sinal óptico intrínseco antes, durante e após a perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup>. Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação de NaBr 5, 7, 9 e 11mM adicionado no ACSF 0-Ca<sup>++</sup>. A perfusão do NaBr foi de 20 min. As imagens dos eventos foram capturadas aproximadamente de 2 em 2 min antes, durante e após a aplicação desse fármaco. A captura das imagens foi simultânea ao PE. .... 69
- Figura 33 – Gráfico do bloqueador SITS representando os eventos (*bursts*) analisados das imagens do sinal óptico intrínseco antes, durante e após a perfusão com SITS. Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação do bloqueador SITS 1mM adicionado na ACSF 0-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup>. A perfusão do SITS foi de 20- 25 min. A captura das imagens foi simultânea ao registro do PE. As imagens dos eventos foram capturadas aproximadamente de 2 em 2 min antes, durante e após a aplicação deste bloqueador de canais de cloreto voltagem-dependentes. .... 70
- Figura 34 – Simulação com NaBr mostrando redução da permeabilidade ao Cl<sup>-</sup>. Com o aumento da concentração de K<sup>+</sup> extracelular para 8 mM, ocorre o acúmulo de Cl<sup>-</sup> intracelular. Conseqüentemente, o potencial de *Nernst* do Cl<sup>-</sup> (E<sub>Cl</sub>) fica mais positivo que o de membrana (E<sub>m</sub>). Portanto, como a permeabilidade do Cl<sup>-</sup> é relativamente alta, o seu acúmulo no meio extracelular causa a despolarização neuronal que sustenta as atividades epileptiformes. Analisando os potenciais de *Nernst* e transmembrânico durante a manobra, pode-se observar que o aumento da [Br]<sub>o</sub> faz com que o E<sub>m</sub> fique negativo, afastando do E<sub>Cl</sub>. Conseqüentemente ocorre uma redução da excitabilidade e os eventos cessam. .... 72
- Figura 35 – 2º Simulação com NaBr demonstra o efeito inibitório. O E<sub>Br</sub> está mais negativo que o E<sub>m</sub> levando o E<sub>m</sub> para próximo, causando uma hiperpolarização neuronal. .... 73
- Figura 36 – Simulação com NaBr demonstra o efeito inibitório do NaBr juntamente com a redução da permeabilidade do Cl<sup>-</sup>. Com o aumento da permeabilidade do Br<sup>-</sup> (10x), este íon se acumula no meio intracelular e E<sub>Br</sub> fica mais positivo que o E<sub>m</sub> causando inicialmente uma despolarização. O aumento de sua concentração reduz a permeabilidade do Cl<sup>-</sup>, levando à hiperpolarização das células. .... 74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mudanças no potencial reverso e proporções da permeabilidade dos ânions .....	25
Tabela 2 – Farmacologia dos canais de cloreto .....	26
Tabela 3 – Composições das soluções de perfusão nos experimentos com fatias de hipocampos de rato (concentrações em mM) .....	47
Tabela 4 – Tabela comparativa dos valores das variáveis entre os grupos ao longo do tempo. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AE**- Atividades epileptiformes
- 9'AC**- 9-antracencarboxilato
- ACSF**- Líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês Artificial Cerebroespinal Fluid)
- ACSF 0-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup>**- Líquido cefalorraquidiano artificial sem Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup>
- Br<sup>-</sup>** - Íon bromo
- CA**- Corno de Ammon
- Cl<sup>-</sup>**- Íons cloro
- CIC**- Canais de cloreto voltagem-dependentes
- [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>**- Concentração de cloreto intracelular
- [Cl<sup>-</sup>]<sub>o</sub>**- Concentração de cloreto extracelular
- DC**- Componente DC
- DE**- Duração dos eventos
- DIDS**- Ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico
- DS**- Descargas em salva (do inglês *burst*)
- EEG**- Eletroencefalograma
- ECl**- Potencial de equilíbrio do cloreto
- FAE's**- Fármacos antiepilépticos
- GD**- Giro denteado
- GABA**- Neurotransmissor ácido gama-aminobutírico
- GABA<sub>A</sub>**- Receptor GABA<sub>A</sub>
- I<sup>-</sup>**-Íons iodo
- IE**- Intervalo entre eventos
- IOS**- Sinal óptico intrínseco (do inglês intrinsic optical signal)
- KBr**- Brometo de potássio
- KCC**- Co-transportador de K-Cl
- [k<sup>+</sup>]<sub>o</sub>**- Concentração de potássio extracelular
- NaBr**- Brometo de sódio
- NPPB**- Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico
- NKCC**- Co-transportador de cloreto Na-K-2Cl
- PS's**- População de espículas (do inglês *Population spikes*)
- PIPS**- Potenciais pós-sinápticos inibitórios

**SITS-** ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeneo-2,2' - disulfônico

**SE-** *Status epilepticus*

**V<sub>m</sub>**- Potencial de repouso de membrana

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1	EPILEPSIA.....	20
2.2	BROMETOS .....	22
2.2.1	<i>Mecanismo de ação .....</i>	<i>23</i>
2.2.2	<i>Permeabilidade dos ânions pelos canais de cloreto .....</i>	<i>24</i>
2.2.3	<i>Canais de cloreto.....</i>	<i>25</i>
2.2.4	<i>Extrusão de cloreto.....</i>	<i>26</i>
2.2.5	<i>Bloqueador de canais de cloreto- SITS.....</i>	<i>27</i>
2.3	HIPOCAMPO.....	27
2.4	CONEXÕES NÃO-SINÁPTICAS .....	30
2.4.1	<i>Sinapses elétricas e tipos de comunicação interneuronal.....</i>	<i>30</i>
2.5	MODELO EXPERIMENTAL.....	32
2.6	MODELAGEM COMPUTACIONAL.....	33
2.6.1	<i>Modelo matemático de atividades epileptiformes sustentadas por conexões não sinápticas .....</i>	<i>33</i>
2.6.2	<i>Modelo matemático do efeito do brometo .....</i>	<i>38</i>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1	GERAL.....	41
3.2	ESPECÍFICOS .....	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
4.1	ANIMAIS .....	42
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	42
4.2.1	<i>Grupo controle .....</i>	<i>42</i>
4.2.2	<i>Grupo NaBr.....</i>	<i>42</i>
4.2.3	<i>Grupo SITS.....</i>	<i>43</i>
4.3	CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE NaCl .....	43
4.4	PREPARO E MANUTENÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS .....	44
4.5	SOLUÇÕES DE PERFUSÃO .....	46

4.6	REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO - EQUIPAMENTOS .....	47
4.6.1	<i>Câmara de perfusão</i> .....	47
4.6.2	<i>Câmara de interface</i> .....	48
4.6.3	<i>Registro do Potencial Elétrico Extracelular (PE) e Sinal Óptico Intrínseco (IOS)</i> .....	50
4.7	ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR E DO IOS.....	52
4.7.1	<i>Potencial Elétrico Extracelular (PE)</i> .....	52
4.7.2	<i>Sinal Óptico Intrínseco (IOS)</i> .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
5.1	POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR .....	56
5.2	SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO.....	67
5.3	SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL .....	70
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>81</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio cerebral caracterizado por manifestações clínicas espontâneas e recorrentes na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril.<sup>1</sup>

A epilepsia acomete 1-2% da população mundial, sem nenhuma distinção social, étnica, geográfica, etária ou sexual. De acordo com Kapczinski e colaboradores (2004) há uma suposta prevalência de 2.800.000 pacientes com epilepsia no Brasil, e 16,5/1.000 na região de Porto Alegre.<sup>2</sup>

A terapia corrente é sintomática.<sup>3</sup> Os fármacos disponíveis reduzem a frequência das crises na maioria dos pacientes, mas somente 40% ficam livres das crises.<sup>4,5</sup>

Em 1857, dois milênios após inúmeras tentativas terapêuticas infrutíferas para o tratamento das crises epiléticas, Sir Charles Locock, um obstetra inglês, introduziu o brometo de potássio para o tratamento da epilepsia.<sup>6</sup> O brometo constituiu o único fármaco eficaz para o tratamento das epilepsias até 1912, quando Alfred Hauptmann, explorando as propriedades sedativas do fenobarbital, observou diminuição na frequência das crises epiléticas em pacientes que faziam uso de brometo.<sup>7</sup> Desde então o fármaco ganhou a reputação de ter um alvo muito pequeno e ser menos efetivo que outros anticonvulsivantes. Em contraste há estudos que mostraram que os brometos são mais efetivos que outros fármacos no tratamento de síndromes especiais tais como crises refratárias tônico-clônicas de infância e para epilepsia severa mioclônica em crianças.<sup>8-11</sup>

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPILEPSIA

O termo epilepsia se refere a uma mudança transitória de comportamento devido a disparos rítmicos e sincrônicos das populações de neurônios no Sistema Nervoso Central (SNC). Também pode se definir como um distúrbio funcional no cérebro caracterizado pela ocorrência de crises periódicas e imprevisíveis.<sup>12</sup> Portanto, epilepsia é um tipo de disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epilépticas), com tendência a se repetirem ao longo da vida do paciente.<sup>13, 14</sup> Essas crises refletem uma atividade anormal, de início súbito, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral. Essa alteração da atividade elétrica cortical, por sua vez, pode ser causada por um número de patologias estruturais e neuroquímicas.<sup>14</sup> Admite-se epilepsia como um grupo de doenças que têm em comum, crises epilépticas que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Crises epilépticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo.<sup>15</sup> As mudanças na excitabilidade neuronal que estão por trás da epileptogênese não só induzem atividade anormal em neurônios individuais, mas também recrutam uma massa crítica de células superexcitáveis em atividades altamente sincronizadas que são propagadas por vias normais ou patológicas.<sup>15</sup>

É importante ressaltar que as crises epilépticas são resultado de descargas anormais excessivas em uma população de neurônios hiperexcitáveis, resultante de correntes elétricas que são fruto da movimentação iônica da membrana celular. As crises epilépticas são uma das formas pelas quais se definem e classificam-se as epilepsias.<sup>15</sup>

Grande parte das crises são geradas nas estruturas cortical e hipocampal, embora outras estruturas subcorticais também estejam envolvidas em alguns tipos de crises. A expressão clínica de uma crise depende do seu local de origem, curso de tempo, e propagação da descarga.<sup>15</sup>

Existem dois aspectos essenciais para a classificação das crises epilépticas segundo a Internacional League Against Epilepsy: a) a região cortical de origem e b) a alteração ou não da responsividade do paciente ao ambiente durante a crise. Assim, quanto à área de origem as crises que derivam da disfunção de uma área cortical localizada, são denominadas crises

parciais, as que decorrem do acometimento simultâneo de múltiplas áreas corticais nos dois hemisférios (ou do córtex como um todo) são chamadas crises generalizadas.<sup>6, 13</sup> Por outro lado, a preservação ou não da responsividade do paciente ao ambiente durante as crises classifica e qualifica as crises parciais. As crises parciais se subdividem em: simples: caracterizam-se pela preservação sem comprometimento da consciência; complexas: acompanhadas por alteração ao ambiente e com comprometimento da consciência; e parciais simples ou complexas evoluindo para crises secundariamente generalizadas. As crises generalizadas (crises de ausência, crises de ausência atípica tônicas, clônicas, mioclônicas e atônicas) são aquelas em que desde o início, os achados clínicos e eletrencefalográficos sugerem o envolvimento de ambos os hemisférios cerebrais.<sup>14</sup>

Estas crises se subdividem em convulsivas (sintoma motor predominante podendo haver ou não alteração da consciência) e não convulsivas (sem sinal motor muito evidente). A classificação das epilepsias e síndromes epiléticas é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, história familiar, achados eletrencefalográficos e prognóstico. Não é correto considerar epilepsia como uma única síndrome, existem múltiplas síndromes epiléticas. A maioria das síndromes epiléticas, entretanto, não tem necessariamente causas comuns. Crises epiléticas são sintomas comuns de doenças neurológicas agudas ou manifestação clínica de doença sistêmica. Na avaliação ou no seguimento do paciente com epilepsia é central a questão da causa das crises epiléticas. Quase todas as doenças que atingem a substância cinzenta, algumas patologias de substância branca (ex: doenças metabólicas) e inúmeras doenças sistêmicas podem causar crises epiléticas. Três fatores causais podem estar envolvidos: predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral (local ou generalizada) e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais. Entre as causas da epilepsia podemos citar fatores genéticos e perinatais, distúrbios do desenvolvimento, doenças infecciosas, fatores tóxicos, trauma ou agentes físicos, distúrbios vasculares, metabólicos e nutricionais, doenças degenerativas e hereditárias.<sup>14</sup>

A epilepsia é mais prevalente em populações infantis, embora não existam fármacos antiepiléticos aprovados pelo FDA, especificamente desenvolvidos para esta população. A terapia corrente para estes é ainda associada com substancial incidência de efeitos colaterais indesejados, desconhecidos efeitos sobre o cérebro normal em desenvolvimento e, muitas vezes, uma substancial falta de eficácia contra crises.<sup>16</sup>

## 2.2 BROMETOS

A partir de sua descoberta em 1826, os sais de brometo foram amplamente utilizados para o tratamento de hepatoesplenomegalia, sífilis e eczemas. Somente em 1853, Sir Charles Locock introduziu o brometo de potássio na terapêutica de seus pacientes com epilepsia. Durante 59 anos, o elixir triplo de brometo (brometo de amônio, brometo de sódio e brometo de potássio) foi amplamente utilizado no tratamento das epilepsias com sucesso.<sup>6</sup>

Com o advento do fenobarbital (1912) e da fenitoína (1937), deu-se início a era moderna dos fármacos antiepilépticos (FAEs). Estes substituíram os sais de brometo em função da menor toxicidade e maior eficácia.<sup>7, 17</sup>

O brometo de sódio apresenta tempo de meia-vida no sangue humano de 10,5-14 dias, sendo necessários 40-50 dias para atingir o *steady-state*. Assim, é difícil se referir à concentração sangüínea e determinar a dosagem ou conduzir o monitoramento terapêutico do fármaco. Além disto, o nível sérico terapêutico desse fármaco é considerado próximo do nível tóxico. Os efeitos adversos do brometo são significantes e podem causar a morte, onde o bromismo severo está associado a uma concentração de brometo acima de 200 mg/dl e se manifesta por dor de cabeça, delírio e demência, que pode ser acompanhado de alucinações.<sup>18, 19</sup>

No entanto, os brometos permanecem ainda hoje como uma alternativa terapêutica para pacientes com epilepsias refratárias aos FAE's vigentes, particularmente em crianças, como crises refratárias tônico-clônicas ou com epilepsia mioclônica grave.<sup>8, 9, 20</sup>

Estudos clínicos recentes com brometos limitam-se à descrição de casos isolados. Exemplos de casos isolados:

- 1º caso: Paciente de 15 meses de idade sofria de retardo de desenvolvimento como seqüela de asfixia neonatal severa. Desde os 5 meses, foram notadas crises clônicas focais do membro superior esquerdo e face com distúrbio de consciência, ocasionalmente generalizadas secundariamente. Apresentava eletroencefalograma (EEG) ictal com descargas localizadas na região anterior direita. As crises tornaram-se mais freqüentes e, aos 7 meses, a incidência excedia 50 ou 60 por dia. Aos 8 meses, sua consciência e respiração estavam afetadas devido às crises recorrentes freqüentes. Regimes terapêuticos com outros fármacos anticonvulsivantes foram tentados, mas sem bons resultados. Aos 15 meses, brometo de potássio (KBr) oral, em dose máxima de 80 mg/kg/dia, foi adicionado ao regime terapêutico, controlando as crises completamente em 1 mês.

- 2º caso: paciente de 8 anos de idade, vinha sendo acompanhado devido a um retardo psicomotor de origem desconhecida desde os 2 meses de idade. Aos 4 meses, desenvolveram-se crises audiogênicas mioclônicas, e estas se transformaram em hemiconvulsões direitas ou esquerdas freqüentemente associadas à generalização secundária desde os 16 meses. Apesar da administração de vários anticonvulsivantes orais, as crises eram diárias e o paciente freqüentemente atingia *status epilepticus* (SE). Esta paciente passou a receber KBr 86mg/kg/dia em monoterapia. As crises tornaram-se menos freqüentes e de menor intensidade depois de 4 dias a partir da administração, cessando por completo no 18º dia.<sup>19</sup>

Estudo recente num centro de epilepsia na Alemanha investigou a eficácia e tolerância do brometo de potássio em 113 pacientes (1 a 20 anos) com epilepsia grave e crises tônico-clônicas generalizadas. A dose inicial foi de 45 mg/kg e aumentada para 70 mg/Kg. 49% dos pacientes não tiveram crises nas últimas quatro semanas do estudo e 31% mostraram uma diminuição maior que 50%.<sup>21</sup>

Um outro estudo demonstra a efetividade do brometo de sódio (30-50mg/Kg/dia) para o tratamento da síndrome Wolf-Hirschorn. Esta patologia é caracterizada por uma deleção parcial do braço curto do cromossomo 4. Os pacientes apresentam crises refratárias e facilmente desenvolvem SE. A eficácia do brometo de sódio neste estudo foi de 100% em quatro indivíduos tratados com este fármaco.<sup>20</sup>

### 2.2.1 Mecanismo de ação

A sua atividade farmacológica tem sido investigada, mas ainda permanece sem uma completa elucidação. Dois mecanismos principais foram propostos para explicar a ação antiepiléptica: hiperpolarização neuronal, através da geração de potenciais pós-sinápticos inibitórios gerados pelo influxo facilitado de íons brometo, e acidose extracelular, gerada a partir da interação com a enzima carbonoanidrase.<sup>17, 22</sup> Em um estudo realizado por Meierkord e colaboradores, foi analisado o efeito do brometo de sódio (NaBr) em fatias de córtex de ratos em dois modelos diferentes de epilepsia (baixo Ca<sup>++</sup> e baixo Mg<sup>++</sup>). O brometo de sódio reduziu as freqüências e bloqueou as descargas induzidas por baixo Ca<sup>++</sup> e as descargas recorrentes induzidas por baixo Mg<sup>++</sup> de uma maneira concentração-dependente. Também se testou a hipótese de um possível envolvimento do NaBr na acidificação do meio extracelular

através da inibição da enzima anidrase carbônica, sendo comparado com a acetazolamida. No entanto, o NaBr não teve efeito na acidose e somente aumentou a alcalose. Neste mesmo trabalho através de um protocolo de estimulação pulso-pareado, usado para monitorar a eficácia da inibição gabaérgica em concentrações de 5 mM de NaBr, foi verificado um aumento significativo na amplitude inibitória pós-sináptica em culturas de neurônios hipocâmpais.<sup>23</sup> Em células ganglionares de rã o brometo de sódio causa hiperpolarização quando ocorre substituição equimolar de cloreto de sódio (112mM) por NaBr em solução de Ringer e também exibe mínimos efeitos excitatórios sinápticos. A hiperpolarização poderia ter ocorrido em consequência da maior permeabilidade da membrana pelo brometo do que ao cloreto.<sup>24</sup> Em culturas de neurônios corticais de ratos foi investigado o efeito do brometo em correntes ativadas por ácido gama-aminobutírico (GABA), empregando técnicas de clampeamento de corrente e registro intracelular. Esses achados sugerem que o brometo potencializa correntes ativadas por GABA em uma concentração terapêutica de 10 mM para 20 mM, determinando uma grande hiperpolarização induzida por GABA. Baseado nestes achados foi postulado que o efeito do brometo pode ocorrer através da potenciação de potenciais pós-sinápticos inibitórios (PIPS) obtidos pelo GABA.<sup>25</sup>

### 2.2.2 Permeabilidade dos ânions pelos canais de cloreto

Os canais aniônicos são permeáveis a todos os ânions haletos. O potencial reverso do Brometo (Br), Iodeto (I), e nitrato ( $\text{NO}_3$ ) são positivos e aumentam nesta ordem (Tabela1). Estes íons têm uma permeabilidade maior que o Cloreto (Cl).<sup>26</sup>

Potenciais reversos indicam que o canal de cloreto seleciona os íons haletos, conforme a seqüência:  $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$  na proporção 1.98:1.46:1:0.44. Após a inclusão dos outros ânions, a seqüência da seletividade alterou:  $\text{NO}_3 > \text{I} > \text{Benzoato} > \text{Br} > \text{SCN} > \text{Cl} > \text{acetato} > \text{propionato} > \text{F} > \text{aspartato} > \text{glutamato} > \text{SO}_4$ .

Tabela 1 – Mudanças no potencial reverso e proporções da permeabilidade dos ânions

Test íon	$\Delta E_{rev}$ mV	N	$P_{test}/P_{Cl}$
Glutamate	-32.5	3	0.13
Aspartate	-29.6	3	0.17
F	-15.7	2	0.44
Propionate	-13.4	2	0.5
Acetate	-8.5	5	0.66
Cl	0	-	1
SCN	7.9	1	1.44
Br	8.2	2	1.46
Benzoate	13.6	2	1.86
I	15.0	2	1.98
Nitrate	19.0	2	2.35
Li	-3.7	7	0.38
Na	0	7	0.25
K	-1.1	3	0.25
Cs	-6.2	2	0.35

Observação:  $\Delta E_{rev}$ =mudanças no potencial reverso;  $P_{test}/P_{Cl}$ =proporções de permeabilidade.

Fonte: Robison e Stokes (1959)<sup>26</sup>

### 2.2.3 Canais de cloreto

A família dos canais de cloreto voltagem-dependentes expressados em níveis significativos no cérebro inclui CIC-2, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 e CIC-7. Somente CIC-2 tem se expressado em neurônios e ativado potenciais de membrana de repouso. No entanto, é possível que os outros membros da família de CIC contribuam para este processo.<sup>27</sup> CIC-2 pode ser ativado por hiperpolarização e acidificação extracelular. É altamente expressado em células piramidais do hipocampo e células de Purkinje no cerebelo e menos abundante em outros neurônios e glia.<sup>28</sup> A seqüência de seletividade do CIC-2 aos haletos é  $Cl^- > Br^- > I^-$ . Isto se aplica tanto à condutância e a seqüência de permeabilidade. Este é pouco inibido por 1mM DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico), moderadamente por 1mM 9-AC ou difenilcarboxilato, e um pouco mais eficientemente por ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzóico (NPPB). Ambos cádmio ( $Cd^{2+}$ ) e zinco ( $Zn^{2+}$ ) também inibem CIC-2. Contudo nenhum bloqueador é específico para um tipo de CIC (tabela 2).<sup>28</sup> A ativação de CIC-2 por  $[Cl^-]_i$  tem sido vista em neurônios hipocampais, pode ser importante para prevenir a acumulação de cloreto no meio intracelular, como pode ocorrer em particular durante um aumento de freqüência na atividade neuronal.<sup>29</sup>

Tabela 2 – Farmacologia dos canais de cloreto

Inhibitor Type	Substance	ClC-1	ClC-2	CFTR	Cl(Ca)	Cl(Vol)	CLIC
Disulfonic stilbenes (irreversibly binding)	DIDS, SITS		o	✓ <sup>+</sup> *	o	+	o
Disulfonic stilbenes (reversibly binding)	DNDS			✓/o*	-	-	o
Arylamino benzoes	DPC	o	o	o		o	
	NPPB			+	+	+	
Fenamates	FFA			o	+	o	
	NFA	o		o	+	o	
Anthracene carboxylates	9-AC	+	o	o	o	o	
Indanylalkanoic acids	IAA-94			-		o	+
Clofibric acid derivatives	Clofibric acid, CPP	+		o			
Sulfonylureas	Glibenclamide, tolbutamide			+	Varies	o	
Other compounds	<i>ts-tm</i> -Calix(4)arene			-			++
	Suramin			✓ <sup>++</sup> *			
	Tamoxifen					++	
Metal ions	Zn <sup>2+</sup>	o	+				
	Cd <sup>2+</sup>		o				

*Observação:* Inibidores de canais de cloreto. ++,  $IC_{50} \leq 5 \mu M$ ; +,  $5 \mu M < IC_{50} \leq 100 \mu M$ ; o,  $100 \mu M < IC_{50} \leq 2 mM$ ; -,  $IC_{50} > 2 mM$ ; DPC, difenilaminocarboxilato; NPPB, ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico; FFA, ácido flufenâmico; NFA, ácido niflúmico; 9-AC, 9-antracenoicarboxilato; IAA, ácido indaniloxiacético; CPP, ácido 2-(p-fenoxicloro) propiônico; DIDS, ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico; SITS, ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfônico, DNDS, ácido 4,4'-dinitro-estilbeno-2,2'-disulfônico. \* Potência com aplicação extracelular/ intracelular

Fonte: Jentsch et al.<sup>28</sup>

## 2.2.4 Extrusão de cloreto

No SNC, vários transportadores de ânions incluindo o co-transportador Na-K-2Cl (NKCC), o co-transportador K-Cl (KCC), Cl/HCO<sub>3</sub> e o trocador Cl/HCO<sub>3</sub> acoplado a Na agem em conjunto para regular o pH intracelular e a concentração de ânions. O KCC2 é o principal co-transportador de cloreto envolvido na manutenção de baixa concentração intracelular de cloreto em neurônios adultos. Quando a [Cl]<sub>i</sub> é extremamente baixa, ou concentração de potássio extracelular [K]<sub>o</sub> é alta, o KCC2 pode funcionar em reverso e serve para colocar Cl<sup>-</sup> para dentro dos neurônios. A expressão de NKCC1 é largamente delimitada às regiões dendríticas onde sua atividade resulta em acúmulo de íons cloreto, enquanto que em neurônios piramidais adultos sua expressão não é detectável e contribui pouco para a homeostase do Cl<sup>-</sup>. Outros co-transportadores tais como Cl/HCO<sub>3</sub> e o trocador Cl/HCO<sub>3</sub> acoplado ao Na funcionam no controle do pH e estão menos envolvidos na regulação da [Cl]<sub>i</sub>.<sup>30</sup> A direção do co-transporte de K<sup>+</sup>- Cl<sup>-</sup> é determinado pelos gradientes transmembrânicos K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Sob condições de baixa [Cl]<sub>i</sub> e elevada [Cl]<sub>o</sub> considerações termodinâmicas sugerem que o KCC2 pode operar de maneira reversa acumulando Cl<sup>-</sup>.<sup>31</sup>

No encéfalo imaturo, onde concentração de cloreto intracelular  $[Cl]_i$  é alta e potencial de equilíbrio ( $E_{Cl}$ ) é positivo ao potencial de repouso de membrana ( $V_m$ ), a ativação de receptores  $GABA_A$  leva a um efluxo de  $Cl^-$  e uma corrente de entrada despolarizante, enquanto que no encéfalo maduro, baixa  $[Cl]_i$  e  $E_{Cl}$  negativo em relação ao  $V_m$  resultam em influxo de  $Cl^-$  e potenciais inibitórios pós-sinápticos hiperpolarizantes (PIPS) durante a ativação de receptores  $GABA_A$ . Esta mudança durante o desenvolvimento indica que a  $[Cl]_i$  não é distribuída passivamente através das membranas, e sim regulada por co-transportadores cátion-cloreto e pelos trocadores  $Cl/HCO_3$ .<sup>32</sup>

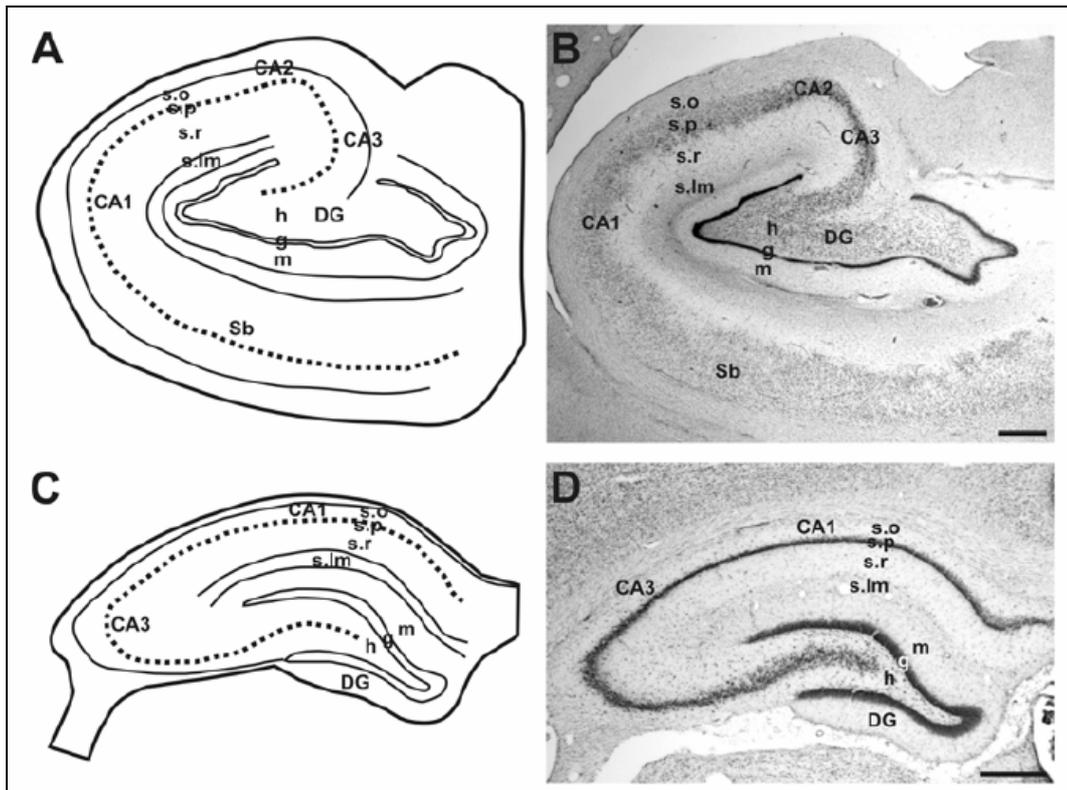
### 2.2.5 Bloqueador de canais de cloreto- SITS

É conhecido que os derivados dos estibenos tais como DIDS e SITS (ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeneo-2,2'-disulfônico), modulam canais aniônicos e transportadores de atividade por ambos mecanismo reversível.<sup>33</sup> Estes compostos contêm pelo menos um grupo isotiocianato, o que permite que para eles reagirem com o  $\epsilon$ -amino grupo de um resíduo de lisina sobre o transportador ou canal aniônico.<sup>33</sup> Segundo L. Vaca existe dois sítios de ligação para o SITS nos canais de cloreto: um com alta afinidade responsável pelo incremento do número de transições de estados de subcondutâncias e uma baixa afinidade vinculada ao sítio envolvido na redução da amplitude dos estados de condutâncias.<sup>34</sup> Em baixas concentrações ( $<45\mu M$ ), SITS aumenta número de transições para os três estados de subcondutâncias numa concentração dependente, ao mesmo tempo reduz o número de transições para o estado totalmente aberto. Este efeito foi mantido após a remoção do SITS da solução de banho. Sugerindo que as modificações no canal induzidas por este bloqueador eram irreversíveis.<sup>34, 35</sup> Um aumento da concentração de SITS reduz a amplitude de todos estados de condutância de uma maneira concentração-dependente. Este efeito foi completamente reversível após remoção do SITS da solução de banho.<sup>34</sup>

## 2.3 HIPOCAMPO

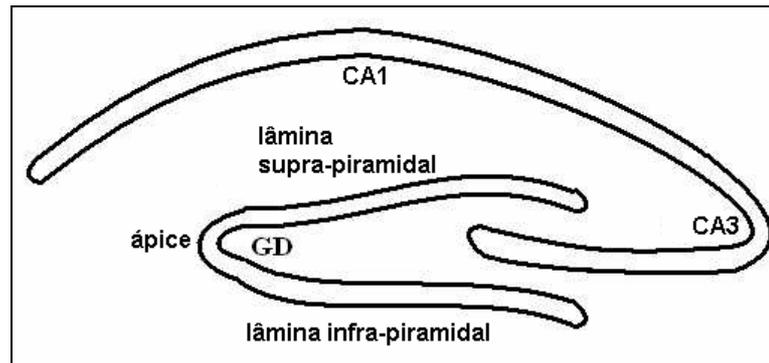
A formação hipocampal é uma estrutura bem definida no lobo temporal, é essencial para memória a longo prazo e tem um papel central na epilepsia do lobo temporal.<sup>36</sup> Os aspectos anatômicos do hipocampo são bastante conhecidos. Existe um alto grau de

similaridade entre o de humano e o de rato (figura 1). Este possui distintas regiões que são interconectadas: o giro denteado (GD), corno Ammon (CA), complexo subicular, e córtex entorrinal.<sup>37</sup> O giro denteado é dividido em três camadas: camada granular, camada molecular e hilus (camada polimórfica) (figura 1).<sup>36</sup>



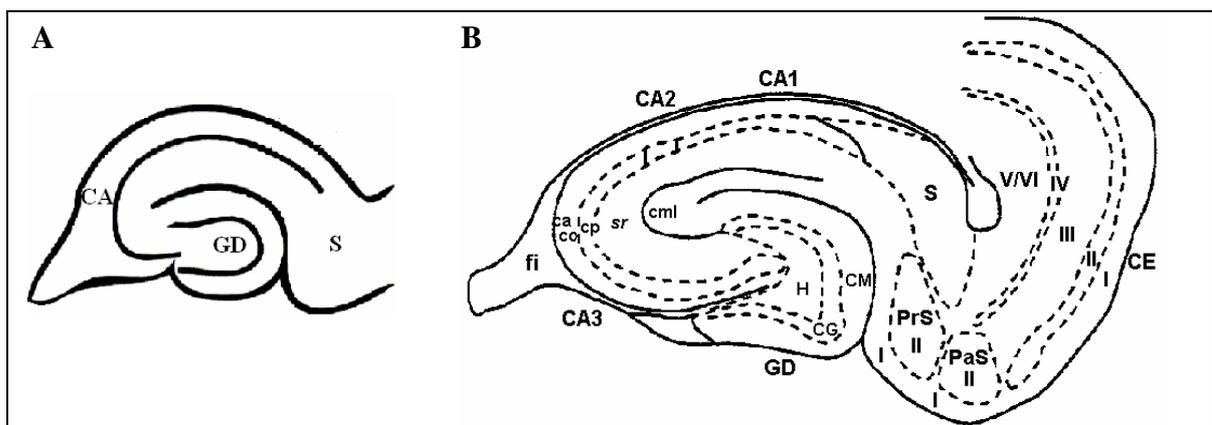
**Figura 1** – Ilustração da anatomia do hipocampo (retirado de Pirttilä, 2006). A- Hipocampo humano; B- Fotomiografia digital ilustrando hipocampo humano; C- Hipocampo de rato com suas subregiões e camadas; D- Fotomiografia digital ilustrando hipocampo de rato. Abreviações: s.o, stratum oriens; s.p, stratum piramidales; s.r, stratum radiatum; s.lm, stratum molecular-lacunosum; Sb, subiculum; m, camada molecular; h, hilus; g, camada granular do giro denteado. Escala das barras: B- 1mm; D- 500  $\mu$ m.

A camada granular contém as principais células do giro denteado. É composta por um empacotamento compacto de corpos celulares de células granulares. Estas células são neurônios que apresentam corpos celulares em forma de grãos, axônios curtos e arborização dendrítica próxima ao corpo celular. O GD também é usualmente dividido em três sub-regiões (Figura II.5): lâminas supra-piramidal, ápice e lâmina infra-piramidal e (Figura 2).<sup>37</sup>



**Figura 2** – Desenho esquemático de um corte transversal do hipocampo mostrando as três sub-regiões do giro denteado. A região do ápice, que corresponde ao ponto de transição entre as lâminas supra-piramidal, que é a região mais próxima da região CA1, e infra-piramidal (modificado de MARTIN *et al.*, 2002).

O giro denteado é a região que recebe a maior porção das fibras do caminho perforante, que terminam principalmente nos dois terços mais externos da camada molecular. É considerado como a principal região de entrada de informações no hipocampo.<sup>37-40</sup> A camada molecular possui dendritos apicais, interneurônios dispersos e terminais sinápticos da via perforante.<sup>36</sup> O hilus inclui diferentes tipos de células como as células mossy e interneurônios, caracterizado como camada polimórfica.<sup>36</sup> O hipocampo propriamente dito é dividido em regiões CA1 (Corno de Ammon 1), CA2 e CA3 (figura 3). O corno Ammon consiste de uma estrutura curva e estratificada, como representado na figura 3, apresentando sete camadas: a molecular; lacunosa, *stratum radiatum*, s.piramidal, s. *alveus*, s. *oriens* e a zona epitelial.<sup>41</sup>



**Figura 3** – Hipocampo de rato e suas regiões (modificado de PAN e STRINGER, 1996). Em A- Representação esquemática da fatia de hipocampo mostrando as três regiões básicas. B- Desenho esquemático, modificado de O'MARA *et al.* (2001), de uma seção horizontal através da formação hipocampal indicando várias regiões (corno Ammon, complexo subicular e giro denteado) e camadas (ca, camada *alveus*; co, camada *oriens*; cp, camada piramidal; sr, *stratum radiatum*; cml, camada molecular - lacunosa; H, hilus; CG, camada granular; CM, camada molecular e camadas I, II, III, IV, V e VI presentes no complexo subicular). O complexo subicular é composto pelo subículo (S), pré-subículo (PrS), pára-subículo (PaS). CE representa o córtex entorrinal e fi a fímbria hipocampal.

Os avanços no conhecimento da citoarquitetura e fisiologia celular do hipocampo, que foram facilitados pela utilização de fatias de tecido, permitiram compreender, além das funções normais do hipocampo, a atuação de drogas e outras manobras experimentais durante experimentos envolvendo epilepsia.

## **2.4 CONEXÕES NÃO-SINÁPTICAS**

### **2.4.1 Sinapses elétricas e tipos de comunicação interneuronal**

Nas sinapses elétricas as células pré e pós-sinápticas comunicam-se por meio de canais especiais, os canais de junções comunicantes, que servem de condutores entre o citoplasma das duas células. Estes canais proporcionam uma passagem de baixa resistência (alta condutividade) para a corrente elétrica fluir entre as duas células.<sup>42</sup> Os canais iônicos têm que gerar corrente iônica suficiente para produzir uma mudança no potencial da célula pós-sináptica.<sup>42</sup> A transmissão elétrica ocorre numa região de contato especializada entre dois neurônios denominada junção comunicante. Nas sinapses elétricas a separação entre dois neurônios é muito menor (3,5nm) que o espaço normal não sináptico, entre neurônios (20 nm). Este espaço estreito é transposto pelos canais de junções comunicantes, estruturas protéicas especializadas que conduzem o fluxo de corrente iônica da célula pré-sináptica para a pós-sináptica.<sup>42, 43</sup> Os canais de junções comunicantes consistem em um par de hemicanais, um na célula pré-sináptica e outro na célula pós-sináptica. Esses hemicanais fazem contato no espaço entre as membranas das duas células, formando uma ponte contínua entre seus citoplasmas. Cada hemicanal é denominado conéxon e esse é formado por seis subunidades protéicas idênticas, as conexinas.<sup>43</sup> A comunicação neuronal elétrica ganhou muita importância a partir das décadas de 70 e 80, quando os pesquisadores descobriram que as comunicações não-sinápticas também eram suficientes para a geração e sustentação das atividades epileptiformes.<sup>43, 44</sup>

A comunicação elétrica entre os neurônios é de três tipos: 1) acoplamento eletrônico entre neurônios específicos através de “gap junctions”, que servem como sinapses elétricas nos invertebrados, mas parecem ser usadas com menos frequências para sinalização elétrica nos vertebrados; 2) acoplamento “efáptico” entre membranas neuronais próximas, mas não

contíguas; e 3) interações de “campo”, onde a geometria de uma estrutura promove a geração de grandes campos extracelulares que alteram a excitabilidade de neurônios vizinhos.<sup>45</sup> As interações efápticas podem ser classificadas como uma transição para a forma final de interação elétrica (efeito de campo elétrico), onde a atividade sincrônica de populações neuronais causa grandes campos elétricos extracelulares. As células comunicantes devem estar eletricamente próximas o suficiente para que as correntes produzidas por uma afetem o potencial de membrana da outra, porém sem contato direto.<sup>45</sup> Os efeitos de campo elétrico ocorrem quando correntes elétricas produzidas por atividades neuronais mudam a excitabilidade de outros neurônios vizinhos não conectados. Ou seja, a corrente gerada por um neurônio é conduzida através do meio extracelular e atinge outros neurônios causando despolarizações em suas membranas.<sup>45</sup> O efeito de campo é mais facilmente identificado em experimentos de indução de atividades epileptiformes, pois, nesse caso, as correntes extracelulares, devidas aos potenciais de ação, são maiores por causa do sincronismo. TAYLOR e DUDEK (1984) mediram o potencial transmembrânico de um neurônio, durante atividades neuronais sincronizadas, e observaram o efeito de campo elétrico através de espículas de despolarização, que ocorrem simultâneas aos *population spikes* no meio extracelular. Os *population spikes* são variações rápidas que são observadas em medidas do potencial extracelular quando ocorrem descargas neuronais síncronas.<sup>46</sup> As flutuações iônicas caracterizam-se pelo movimento dos íons ao longo do meio extracelular. Podem contribuir para a comunicação neuronal, uma vez que a membrana celular neuronal é sensível às variações de concentrações iônicas nas faces intra e extracelulares. Íons  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $Mg^{++}$  aparecem em grandes quantidades no meio extracelular e contribuem de maneira significativa para as funções neuronais do sistema nervoso.<sup>45</sup>

Tanto por meio de simulação, quanto por realizações de experimentos, observa-se que a variação da concentração extracelular de  $K^+$  causa grande alteração na excitabilidade neuronal. O aumento da concentração extracelular de  $K^+$  gera a despolarização das membranas celulares neuronais.<sup>47</sup> Uma diminuição no espaço extracelular aumenta as interações não-sinápticas por flutuações nas concentrações iônicas extracelulares e pelo aumento da resistência extracelular, reforçando assim diretamente efeitos de campo elétrico.

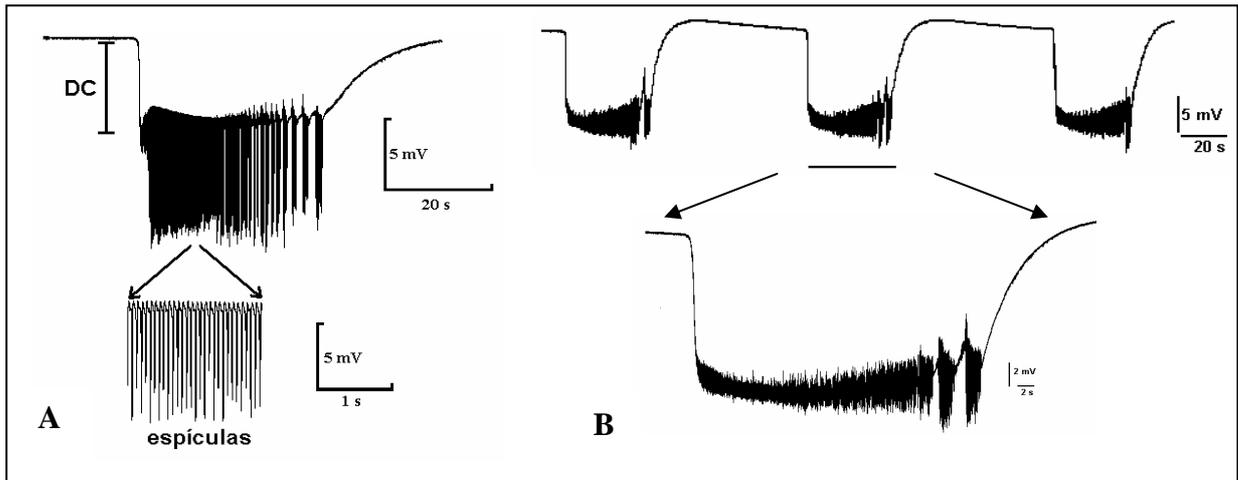
## 2.5 MODELO EXPERIMENTAL

Os experimentos de indução de atividades epileptiformes (AE) em fatias de hipocampo de ratos, nos quais os íons de  $\text{Ca}^{++}$  são suprimidos do líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) sem  $\text{Ca}^{++}$  do tecido, mostram a importância das comunicações neuronais não-sinápticas sobre as crises epiléticas.<sup>45, 47, 49</sup> Os eventos epileptiformes na região do giro denteado apresentam atividades neuronais síncronas com maiores durações e amplitudes, sob condições experimentais de alta concentração extracelular de  $\text{K}^+$  e baixa concentração de  $\text{Ca}^{++}$ . (figura 4).<sup>47, 50, 51</sup>



**Figura 4** – Registro de eventos epileptiformes não-sinápticos (salva de espículas formadas por potenciais de ação síncronos, denominadas *population spikes*, após um deslocamento negativo da linha de base) característicos das regiões do hipocampo, após perfusão com solução sem  $\text{Ca}^{++}$  e com alta  $[\text{K}^+]$ . Na região CA1, eventos epileptiformes, os *bursts* apresentam PS's com grandes amplitudes, na região CA3, os PS's ocorrem de forma mais estável e com menor intervalo de tempo entre os eventos. E no GD, há atividade neuronal intensa, com descargas em salva prolongadas e com variação negativa da linha de base seguido de PS's de grandes amplitudes (retirado de DUDEK *et al.*, 1993).

A AE típica da supressão de conexões sinápticas caracterizam-se por uma salva de espículas, formadas pelo disparo simultâneo de potenciais de ação, denominadas de populações de espículas (do inglês *population spike*), superpostas a um deslocamento negativo da linha de base (DC). Esses eventos são chamados de descargas em salva (DS), caracterizadas por salvas de potenciais de ação (figura 5).<sup>43, 49</sup>

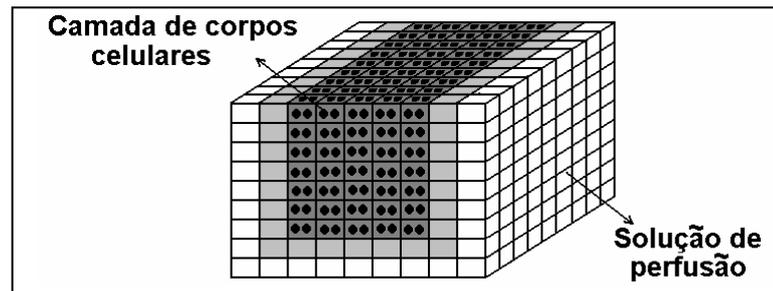


**Figura 5** – Descargas em salva (DS) características da região do giro denteado. Em A- Descarga em salva (*burst*) avaliada durante as atividades epileptiformes induzidas através do protocolo experimental alto- $K^+$  (8 mM) e zero- $Ca^{++}$  adicionado. DS é caracterizado por um deslocamento negativo e lento do potencial extracelular, em nível DC, simultâneo com a ocorrência de uma seqüência de atividades de alta frequência, os PS's. Em B exemplo de uma seqüência de descarga em salva.

## 2.6 MODELAGEM COMPUTACIONAL

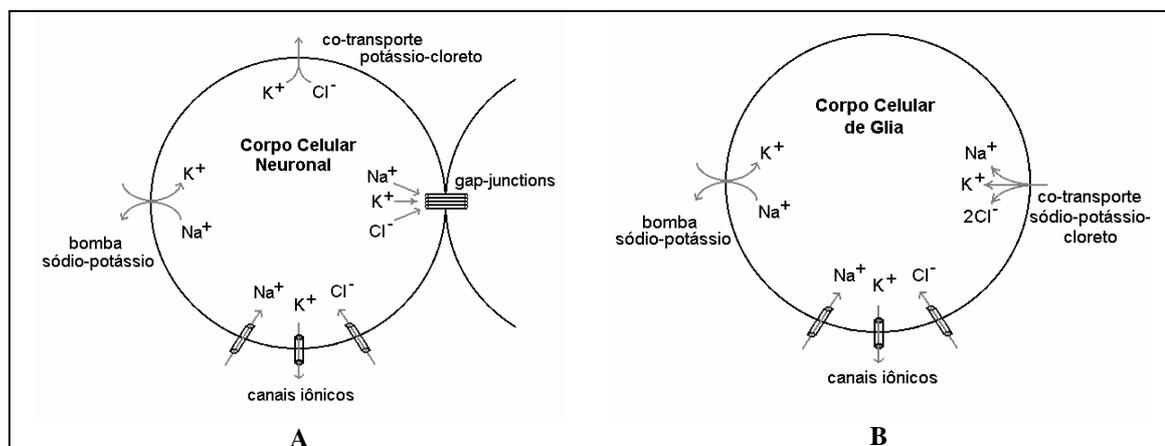
### 2.6.1 Modelo matemático de atividades epileptiformes sustentadas por conexões não sinápticas

O estudo das atividades epileptiformes não-sinápticas, no giro denteado de hipocampo de rato, é um instrumento importante para a investigação da influência dos mecanismos subcelulares não-sinápticos durante crises epiléticas. Isso motivou o desenvolvimento de um modelo computacional, que descreve as propriedades eletroquímicas desses mecanismos, para simular atividades epileptiformes sustentadas apenas por modulações não-sinápticas. Esse modelo considera o meio extracelular formado por uma rede tridimensional de compartimentos (Figura 6).<sup>52</sup> A cada um dos compartimentos extracelulares mais internos (cinza escuro) são conectados dois corpos celulares (esferas pretas), um glial e outro neuronal, representando a camada de corpos celulares do giro denteado. Os compartimentos extracelulares intermediários (cinza claro) não são conectados a compartimentos intracelulares e representam as regiões, do giro denteado, formadas principalmente por arborizações dendríticas. Os planos de compartimentos extracelulares das bordas laterais e da base (brancos) têm suas concentrações iônicas mantidas constantes e representam a solução de perfusão do tecido em experimentos.<sup>53</sup>



**Figura 6** – Estrutura tridimensional do modelo para representar o tecido banhado pela solução de perfusão (retirado de RODRIGUES, 2003).

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são as espécies iônicas representadas. O  $\text{Ca}^{++}$  não é incluído pois se objetiva simular atividades epileptiformes não sinápticas características de protocolos experimentais com zero- $\text{Ca}^{++}$  extracelular. A movimentação de cada espécie iônica no meio extracelular é descrita por uma equação de eletrodifusão. A movimentação iônica através da membrana neuronal, entre os meios intra e extracelular, é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na/K e co-transporte K-Cl (KCC) (Figura 7). Além desses mecanismos, são consideradas também as *gap-junctions* promovendo a interconexão entre os citoplasmas de células adjacentes. Para a membrana glial, foram considerados canais iônicos com permeabilidades constantes, bomba de Na/K e o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC) (Figura 7B).



**Figura 7** – A - Representação esquemática dos mecanismos transmembrânicos de transporte iônico para neurônios. B - Glia (retirado de RODRIGUES, 2003).

Equações:

$\frac{\partial C_w^o}{\partial t} = \frac{D_w}{\lambda^2} \nabla^2 C_w^o + \frac{z_w F D_w}{RT \lambda^2} \bar{\nabla} C_w^o \bar{\nabla} V^o + \frac{z_w F D_w}{RT \lambda^2} C_w^o \nabla^2 V^o$ , (2.2) onde  $C_w^o$  (mM) e  $D_w$  (cm<sup>2</sup>/s) são, respectivamente, a concentração extracelular e a constante de difusão do íon  $w$  (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>),  $F$  (C/mMol) é a constante de Faraday,  $R$  (mVC/KmMol) é a constante de Boltzmann,  $T$  (K) a temperatura do tecido,  $\lambda$  a tortuosidade do meio,  $z_w$  a valência e  $V^o$  (mV) é o potencial extracelular.

$\bar{\nabla} V^o$  é calculado considerando que a variação de  $V^o$ , durante as descargas epileptiformes, é a soma de uma componente em nível DC,  $V_{DC}$ , com outra em alta frequência,  $V_{AF}$ . Para o cálculo de  $\bar{\nabla} V_{DC}$  utiliza-se a equação derivada por<sup>53</sup>:

$$\bar{\nabla} V_{DC} = -\frac{RT}{F} \frac{z_{Na} D_{Na} \bar{\nabla} C_{Na} + z_K D_K \bar{\nabla} C_K + z_{Cl} D_{Cl} \bar{\nabla} C_{Cl}}{z_{Na}^2 D_{Na} C_{Na} + z_K^2 D_K C_K + z_{Cl}^2 D_{Cl} C_{Cl}}, \quad (2.3)$$

Para a componente em alta frequência  $V_{AF}$ , denominada *PS's*, utiliza-se uma equação de campo quase-estacionário<sup>54</sup>:

$$V_{AF} = \sum_{n=1}^N \frac{1}{4\pi\sigma} \frac{I_n^m}{\xi d_n}, \quad (2.4), \text{ sendo } N \text{ o número total de neurônios e } d_n \text{ (cm) a distância entre o } n\text{-ésimo neurônio e o ponto onde está sendo calculado o potencial. } \sigma \text{ (S/cm) é a condutividade elétrica efetiva do tecido, } \xi \text{ é um fator de contração do volume extracelular e } I_n^m \text{ (mA) é a corrente transmembrânica total do } n\text{-ésimo neurônio.}$$

Para a movimentação iônica através da membrana neuronal é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na/K e co-transporte K-Cl (KCC). Para a membrana glial, foram considerados canais iônicos com permeabilidades constantes, bomba de Na/K e o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC).

A movimentação iônica através da membrana neuronal é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na/K e co-transporte K-Cl (KCC). Para a membrana glial, foram considerados canais iônicos com permeabilidades constantes, bomba de Na/K e o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC).

A densidade de corrente iônica de um íon  $w$ ,  $J_w^{ci}$  (mA/cm<sup>2</sup>), através do canal correspondente, é calculada pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)<sup>55</sup> para corrente:

$$J_w^{ci} = \frac{P_w F^2 z_w^2 V_m}{RT} \times \frac{C_w^i - C_w^o e^{-\frac{z_w F V_m}{RT}}}{1 - e^{-\frac{z_w F V_m}{RT}}}, \quad (2.5) \text{ onde } V_m \text{ (mV) é o potencial transmembrânico e } P_w \text{ (cm/s) é a permeabilidade que é calculada de acordo com as condutâncias do modelo de}$$

HODGKIN e HUXLEY, 1952.  $C_w$  (mM) é a concentração de  $w$ , sendo que os índices  $i$  e  $o$  indicam os meios intra e extracelulares, respectivamente.

A densidade de corrente da bomba de Na/K,  $J_{Na/K}$  (mA/cm<sup>2</sup>), é calculada associando-a à corrente de um íon fictício A<sup>+</sup> e aplicando a equação de GHK de corrente (Equação 2.5) a esse íon. Para estimar as concentrações desse íon A<sup>+</sup>, considera-se o equilíbrio instantâneo das reações de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, ADP e P com a bomba e derivam-se as seguintes equações:

$$C_A^i = Ke_A^i \frac{C_{ATP}^i}{C_{ATP}^i + Kd_{ATP}^i \left(1 + \frac{C_{ADP}^i C_P^i}{Kd_{ADP,P}^i}\right)} \times \frac{(C_{Na}^i)^3}{\left[C_{Na}^i + Kd_{Na}^i \left(1 + \frac{C_K^i}{Kd_K^i}\right)\right]^3} \frac{(C_K^o)^2}{\left[C_K^o + Kd_K^o \left(1 + \frac{C_{Na}^o}{Kd_{Na}^o}\right)\right]^2}, \quad (2.6)$$

$$C_A^o = Ke_A^o \frac{C_{ADP}^o C_P^o}{C_{ADP}^o C_P^o + Kd_{ADP,P}^o \left(1 + \frac{C_{ATP}^o}{Kd_{ATP}^o}\right)} \times \frac{(C_{Na}^o)^3}{\left[C_{Na}^o + Kd_{Na}^o \left(1 + \frac{C_K^o}{Kd_K^o}\right)\right]^3} \frac{(C_K^i)^2}{\left[C_K^i + Kd_K^i \left(1 + \frac{C_{Na}^i}{Kd_{Na}^i}\right)\right]^2}, \quad (2.7) \text{ onde } Kd_y \text{ (mM) é a constante de dissociação}$$

de  $y$  (ATP, ADP/P, Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>) e  $Ke_A$  (mM<sup>-5</sup>) a constante de equilíbrio da reação de formação de íons A<sup>+</sup>.

A densidade de fluxo devido ao KCC,  $\phi_{KCC}$  (mMol/scm<sup>2</sup>), é calculada (Equação 2.8) considerando as reações desses íons com a proteína do co-transporte em estado de equilíbrio, em cada instante de tempo.

$$\phi_{KCC} = Q_{KCC} \frac{C_K^i C_{Cl}^i - C_K^o C_{Cl}^o}{(Kd_K^{KCC} + C_K^i + C_K^o)(Kd_{Cl}^{KCC} + C_{Cl}^i + C_{Cl}^o)}, \quad (2.8) \text{ onde } Kd_K^{KCC} \text{ e } Kd_{Cl}^{KCC}, \text{ em mM, são as}$$

constantes de dissociação de K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, respectivamente, e  $Q_{KCC}$  (mmol/scm<sup>2</sup>) uma constante de proporcionalidade relacionada à densidade de enzimas cotransportadoras.

Analogamente ao KCC, a densidade de fluxo do NKCC,  $\phi_{NKCC}$  (mMol/scm<sup>2</sup>), é determinada considerando o equilíbrio instantâneo das reações de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> com a enzima co-transportadora:

$$\phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \frac{C_{Na}^i C_K^i (C_{Cl}^i)^2 - C_{Na}^o C_K^o (C_{Cl}^o)^2}{ABC}, \quad (2.9) \text{ onde } A = Kd_{Na}^{NKCC} + C_{Na}^i + C_{Na}^o, \quad B = Kd_K^{NKCC} + C_K^i + C_K^o,$$

$C = (Kd_{Cl}^{NKCC} + C_{Cl}^i + C_{Cl}^o)^2$ , sendo  $Kd_{Na}^{NKCC}$ ,  $Kd_K^{NKCC}$  e  $Kd_{Cl}^{NKCC}$ , em mM, as constantes de dissociação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e  $Q_{NKCC}$  (mMol/scm<sup>2</sup>) uma constante de proporcionalidade relacionada ao número de enzimas.

O modelo também considera as comunicações neuronais via *gap-junctions* e o efeito de campo elétrico. Para calcular a densidade de corrente,  $J_w^{gj}$  (mA/cm<sup>2</sup>), através das *gap-junctions*, a equação de Nernst-Planck<sup>55</sup> é aplicada de forma discreta a cada uma das espécies iônicas:

$$J_w^{gj} \approx -z_w F k D_w \left( \frac{C_w^{(1)} - C_w^{(2)}}{l} + \frac{z_w F D_w}{RT} C_w^{(1)} \frac{V_m^{(1)} - V_m^{(2)}}{l} \right), \quad (2.10)$$
 onde  $k$  (cm<sup>-1</sup>) é uma constante de proporcionalidade, os índices (1) e (2) representam dois neurônios adjacentes quaisquer e  $l$  (cm) é a distância entre os centros dos neurônios (1) e (2).

Para o efeito de campo elétrico<sup>54</sup>, de acordo, é assumido que a densidade de corrente total,  $J_{ef}$  (mA/cm<sup>2</sup>), provocada por uma população de neurônios, que atravessa a membrana de um neurônio seja dada por:

$$J_{ef} = \sum_{n=1}^N \tau \cdot \frac{I_n^m}{d_n}, \quad (2.11)$$
 onde  $I_n^m$  (mA) é a corrente transmembrânica total do neurônio  $n$ ,  $d_n$  (cm)

é a distância entre o  $n$ -ésimo neurônio e a célula na qual a corrente está sendo calculada,  $N$  é o número de neurônios e  $\tau$  (cm<sup>-1</sup>) é uma constante de proporcionalidade.

Para calcular o potencial transmembrânico, admite-se o equilíbrio dinâmico para o qual o somatório das correntes transmembrânicas é nulo e deriva-se uma equação modificada em relação à equação de GHK de potencial:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{Na} C_{Na}^o + P_K C_K^o + P_{Cl} C_{Cl}^i + P_A C_A^o + f + f_2}{P_{Na} C_{Na}^i + P_K C_K^i + P_{Cl} C_{Cl}^o + P_A C_A^i + 2} \right), \quad (2.12)$$
 onde,  $f = -\frac{A_{gj} \sum J_w^{gj}}{A_m} \left( e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1 \right) \frac{RT}{F^2 V_m} + e^{\frac{FV_m}{RT}}$ ,

$f_2 = -J_{ef} \cdot \left( e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1 \right) \cdot \frac{RT}{F^2 V_m} + e^{\frac{FV_m}{RT}}$ , sendo  $A_{gj}$  a área total das *gap-junctions* e  $A_m$  e a área total da

membrana celular.

O modelo também considera a variação dos volumes extra e intracelulares. A equação para o cálculo do volume intracelular,  $Vol_i$  (dm<sup>3</sup>), neuronal ou glial, é derivada admitindo o equilíbrio osmótico em cada instante de tempo e que o volume total,  $Vol_{total}$  (dm<sup>3</sup>), extracelular mais neuronal e glial, é constante (Equação 2.13). Com a última consideração, a variação do volume extracelular é igual ao negativo da soma das variações dos volumes neuronal e glial.

$$Vol_i = \frac{Vol_{total} (\sum \eta_w^i + \eta_s^i)}{\sum \eta_w^o + \eta_s^o + \sum \eta_w^i + \eta_s^i}, \quad (2.13)$$
 sendo  $\eta_w$  (mMol) o número de mols do íon  $w$  e  $\eta_s$  (mMol) o

número de mols de outros solutos presentes no tecido, os quais não são considerados neste modelo.

Para simular a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas características do GD, quando se usa protocolo experimental com alto- $K^+$  e zero- $Ca^{2+}$ , a concentração extracelular de  $K^+$  dos compartimentos que figuram a solução de perfusão foi aumentada. A representação da perfusão com zero- $Ca^{2+}$  está originalmente incluída na estrutura do modelo, uma vez que as conexões sinápticas não foram incorporadas.<sup>47</sup>

## 2.6.2 Modelo matemático do efeito do brometo

### 1ª Simulação do efeito do NaBr sobre a permeabilidade do Cloreto

O íon  $Br^-$  foi incluído no modelo de atividades epileptiformes não-sinápticas descrito acima, podendo movimentar-se no meio extracelular por eletrodifusão e através da membrana celular. Para incorporá-lo no modelo, foi considerado que esse íon pode reduzir a permeabilidade dos canais para  $Cl^-$ . Para isso, foi admitido que a permeabilidade de  $Cl^-$  é proporcional à concentração de canais abertos permeável a esse ânion:

$P_{Cl} = P_{Cl}^{max} [CA]$ , (1) onde  $P_{Cl}^{max}$  é a permeabilidade máxima de  $Cl^-$  e  $[CA]$  é a concentração de canais abertos, a qual foi considerada normalizada, podendo apresentar como maior valor a unidade (que representa 100 % de canais abertos). Considerando a interação do  $Br^-$  com esses canais de  $Cl^-$ , a seguinte equação foi incorporada para descrever o bloqueio de canais exercido pelo  $Br^-$ :

$\frac{d[CA]}{dt} = \alpha [Br]^\theta [CA] - \beta [CB]$ , (2) onde:  $CB$  representa a concentração canais bloqueados pelo  $Br^-$ ;

Foi considerado também que o  $Br^-$  passa através da membrana por meio de co-transportes KCC e NKCC. Para traduzir esse mecanismo, as equações que representam os fluxos promovidos pelo KCC e NKCC foram alteradas da seguinte forma:

$$\Phi_{KCC} = Q_{KCC} \frac{[K^+]_i [Cl^-]_i - [K^+]_o [Cl^-]_o}{\left( K_{K,KCC} + [K^+]_i + [K^+]_o \right) \left( K_{Cl,KCC} \left( 1 + \frac{[Br^-]_i}{K_{Br,KCC}} + \frac{[Br^-]_o}{K_{Br,KCC}} \right) + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o \right)}, \quad (3)$$

$$\Phi_{KCC} = Q_{KCC} \frac{[K^+]_i [Br^-]_i - [K^+]_o [Br^-]_o}{\left( K_{K,KCC} + [K^+]_i + [K^+]_o \right) \left( K_{Br,KCC} \left( 1 + \frac{[Cl^-]_i}{K_{Cl,KCC}} + \frac{[Cl^-]_o}{K_{Cl,KCC}} \right) + [Br^-]_i + [Br^-]_o \right)}, \quad (4)$$

$$\Phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \frac{[Na^+]_i [K^+]_i [Cl^-]_i^2 - [Na^+]_o [K^+]_o [Cl^-]_o^2}{A \cdot B \cdot C \cdot D}, \quad (5)$$

onde

$$A = \left( K_{Na,NKCC} + [Na^+]_i + [Na^+]_o \right)$$

$$B = \left( K_{K,NKCC} + [K^+]_i + [K^+]_o \right)$$

$$C = \left( K_{Cl,NKCC} \left( 1 + \frac{[Br^-]_i}{K_{Br,NKCC}} + \frac{[Br^-]_o}{K_{Br,NKCC}} \right) + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o \right)$$

$$D = \left( K_{Br,NKCC} \left( 1 + \frac{[Cl^-]_i}{K_{Cl,NKCC}} + \frac{[Cl^-]_o}{K_{Cl,NKCC}} \right) + [Br^-]_i + [Br^-]_o \right)$$

$$\Phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \frac{[Na^+]_i [K^+]_i [Cl^-]_i [Br^-]_i - [Na^+]_o [K^+]_o [Cl^-]_o [Br^-]_o}{A \cdot B \cdot C \cdot D}, \quad (6)$$

onde

$$A = \left( K_{Na,NKCC} + [Na^+]_i + [Na^+]_o \right)$$

$$B = \left( K_{K,NKCC} + [K^+]_i + [K^+]_o \right)$$

$$C = \left( K_{Cl,NKCC} \left( 1 + \frac{[Br^-]_i}{K_{Br,NKCC}} + \frac{[Br^-]_o}{K_{Br,NKCC}} \right) + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o \right)$$

$$D = \left( K_{Br,NKCC} \left( 1 + \frac{[Cl^-]_i}{K_{Cl,NKCC}} + \frac{[Cl^-]_o}{K_{Cl,NKCC}} \right) + [Br^-]_i + [Br^-]_o \right)$$

## 2ª Simulação considerando o efeito inibitório do Br<sup>-</sup>.

Nesta simulação, ao incorporar o Br<sup>-</sup> no modelo, foi considerado que ele pode passar através dos canais de Cl<sup>-</sup>, porém, com uma permeabilidade maior (1,4 vezes).<sup>26</sup> Portanto, foi utilizada a equação de Goldman-Hodgkin-Katz de corrente para calcular o fluxo do Br<sup>-</sup> através da membrana:

$$\Phi_{Br} = P_{Br} Z_{Br} F \frac{V_m}{RT} \frac{[Br]_i e^{\frac{Z_{Br} F V_m}{RT}} - [Br]_o}{e^{\frac{Z_{Br} F V_m}{RT}} - 1}, \quad (7)$$

onde  $P_{Br} = 1,4P_{Cl}$ ,  $F$  é a constante de Faraday,  $R$  a constante universal dos gases e  $T$  a temperatura em K.  $V_m$  é o potencial transmembranar que, a partir da inclusão do fluxo de  $Br^-$  por canais iônicos, passou a ser calculado por:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{Na}[Na^+]_o + P_K[K^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i + P_A[A^+]_o + P_{Br}[Br^-]_i + f_{gj} + f_{ef} + \gamma}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o + P_A[A^+]_i + P_{Br}[Br^-]_o + 2 + \xi} \right), \quad (8)$$

onde  $f_{gj}$  e  $f_{ef}$  são termos que dependem das correntes por gap-junctions e do efeito de campo neuronal, respectivamente.  $P_w$  é a permeabilidade do íon  $w$  ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$  ou  $A^+$ ). O íon  $A^+$  é utilizado para calcular o efeito da bomba sobre o potencial transmembrânico. Nessa simulação, não foi considerada a redução da permeabilidade do  $Cl^-$  promovida pelo  $Br^-$ , descrita pelas equações (1) e (2).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Estudar o efeito do brometo de sódio sobre a atividade epileptiforme, induzidas por supressão da atividade sináptica por perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup> e alto K<sup>+</sup> em fatias de hipocampo de rato.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

1. Avaliar o efeito do brometo de sódio em concentrações crescentes (5, 7, 9, 11 mM) na atividade epileptiforme interictal e ictal induzida por perfusão com ACSF zero-Ca<sup>++</sup> e alto K<sup>+</sup>, analisando as variáveis amplitude da componente DC, população de espículas (PS), intervalo entre eventos (IE) e duração dos eventos (DE), em fatias de hipocampo de ratos.
2. Determinar o possível envolvimento dos canais de cloreto voltagem-dependentes nos experimentos e simulação computacional.
3. Avaliar o efeito do bloqueador de canais de cloreto (ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2-disulfônico, SITS) nos experimentos com indução da atividade epileptiforme pela solução sem cálcio.
4. Avaliar a distribuição espaço- temporal da ação do brometo de sódio sobre a AE utilizando o registro do sinal óptico intrínseco.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 ANIMAIS**

Para a realização deste estudo, foram utilizados 29 ratos da linhagem *Wistar*, machos, faixa etária 4 a 5 semanas, provenientes do biotério da Universidade Federal de São João Del Rei (MG). Os animais permaneceram em ambiente climatizado, recebendo ração padronizada e água ad libitum, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos deste estudo estiveram de acordo com o protocolo 1081/05 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

### **4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

#### **4.2.1 Grupo controle**

Este grupo consistiu de 3 fatias cerebrais que foram perfundidas na câmara de interface com ACSF Normal por 40min. Esta solução apresentava a seguinte composição: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glicose, com pH ajustado 7,4. Após perfundiu-se com ACSF zero-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup> para indução das atividades epileptiformes.

#### **4.2.2 Grupo NaBr**

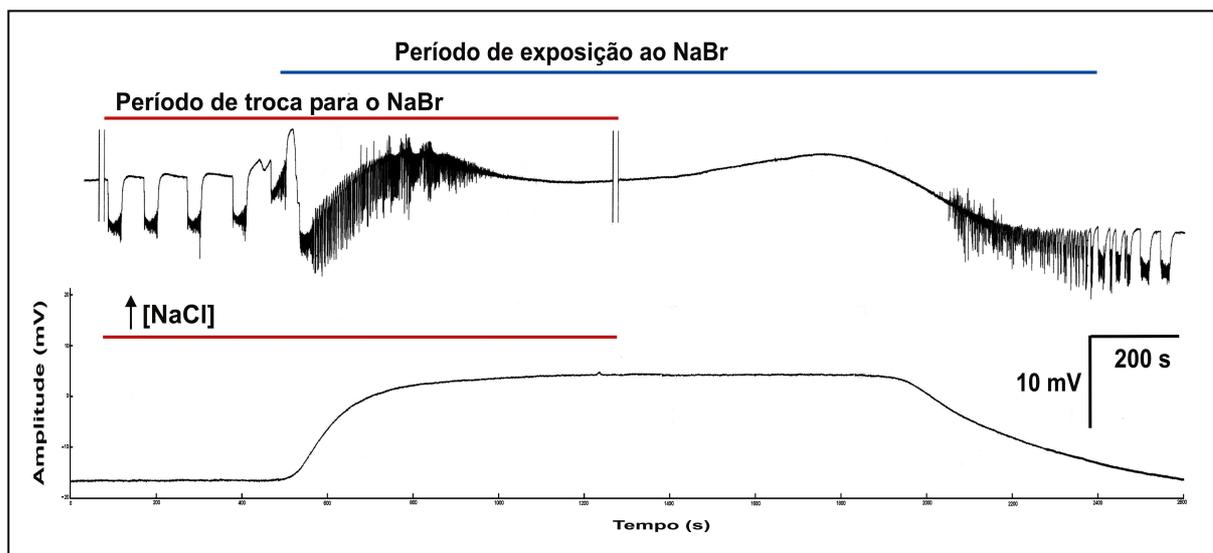
Os experimentos (n=23) foram realizados em fatias de hipocampo de ratos *Wistar* (4 a 6 semanas). Após indução das atividades epileptiformes por perfusão com ACSF zero-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup> (8 mM), o Br<sup>-</sup> foi aplicado (tempo: 20min) por substituição nas seguintes concentrações: 5, 7, 9 e 11 mM de NaCl por 5, 7, 9 e 11 mM de NaBr, numa solução sem Ca<sup>++</sup> e com alto K<sup>+</sup> (8mM).

### 4.2.3 Grupo SITS

Para os registros (n=3) com o bloqueador de canais de cloreto (SITS), esse foi dissolvido em ACSF zero- $\text{Ca}^{++}$  + alto  $\text{K}^+$  em uma concentração final de 1mM e aplicado por perfusão (tempo: 20min a 30min).

### 4.3 CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE NaCl

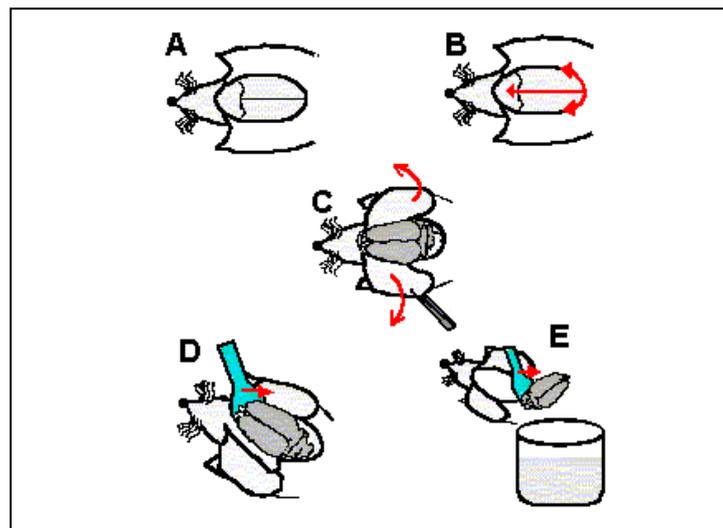
Para saber a chegada do brometo e o tempo de exposição a esse fármaco durante as AE foi estimado o comportamento da concentração do NaBr e assim o tempo de exposição a esse fármaco. Para isso foi feita uma curva de NaCl, todo final de experimento, sendo que no lugar do brometo utilizou-se alta concentração NaCl e foi registrado o potencial elétrico extracelular. Pela curva foi possível verificar que o brometo de sódio demora um certo tempo para chegar às fatias como indicado pela linha vermelha e permanece atuando por um tempo como indicado pela linha azul (Figura 8). Assim é possível verificar as descargas em salva (*bursts*) que estão sobre a influência do brometo.



**Figura 8** – Exemplo típico de um experimento com aplicação de brometo. A linha vermelha indica o tempo para o NaBr chegar à fatia e a linha em azul o seu tempo de atuação.

#### 4.4 PREPARO E MANUTENÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS

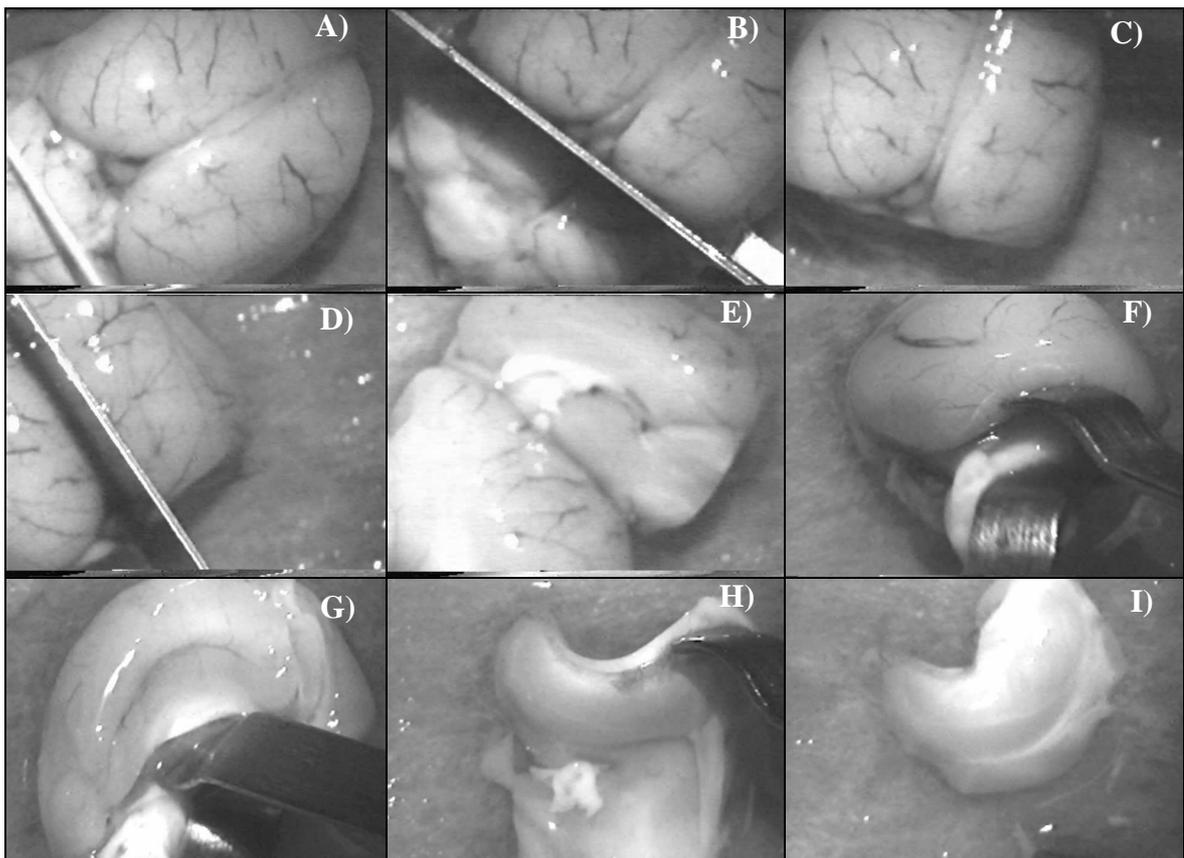
Para o isolamento dos hipocampos os animais foram anestesiados com nebulização com éter etílico (P.A 100%), uma vez que diferentes tipos de anestésicos, devem ter rápida reversibilidade, para se evitar interferências sobre as medidas experimentais. Imediatamente a calota craniana foi exposta fazendo-se um corte longitudinal no escalpo (figura 9A), depois foi cortada mediana e lateralmente (figura 9 B).<sup>56</sup> Posteriormente as partes superiores da calota craniana foram removidas (figura 9C) permitindo a retirada do encéfalo (figura 9D). Já completamente desconectado, o encéfalo foi retirado e imerso em solução ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial) normal (composição: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glicose), resfriada 0 a 2 °C (Figura9 E).



**Figura 9** – Esquema do procedimento realizado para a retirada do encéfalo da cavidade craniana. A) abertura do escalpo; B) corte mediano e lateral na calota craniana; C) remoção das partes superiores da calota craniana; D) retirada do encéfalo da cavidade craniana; E) remoção do mesmo para uma solução nutritiva.

Em um segundo momento, para separação dos hipocampos, o encéfalo foi removido para uma placa de Petri forrada com papel filtro e banhado constantemente com a mesma solução ACSF normal. Com auxílio de um bisturi foram feitas duas incisões para separar, primeiro, o cerebelo (figura 10, partes A, B e C) e, depois, os dois hemisférios cerebrais (partes D e E). Enquanto um dos hemisférios foi dissecado, o outro foi mantido imerso em solução ACSF normal resfriada (0 a 2° C). O procedimento de dissecação de cada hemisfério

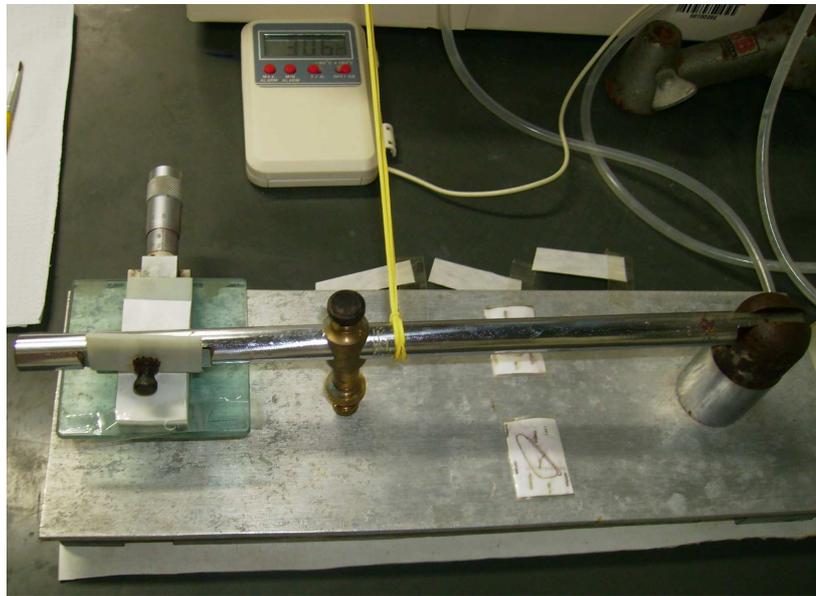
foi iniciado com um corte para retirada do córtex frontal. A face desse corte foi utilizada para apoiar o restante do hemisfério cerebral sobre o papel filtro. Duas micro-espátulas especiais auxiliaram para retirada do tálamo (parte F). Após remoção do tálamo, é fácil visualizar o dorso inferior do hipocampo. Introduziu-se cuidadosamente as espátulas por baixo de seu dorso, o hipocampo foi virado (partes G, H) e completamente isolado (parte I).



**Figura 10** – Isolamento do hipocampo do restante do cérebro de rato. Nas fotos A, B, C, D e E, os cortes feitos para facilitar a dissecção. Em F é mostrado um detalhe da separação do tálamo, com ajuda de micro-espátulas. Em G, H e I, o hipocampo foi isolado do restante do córtex (retirado de CARVALHO, 2003).

Após o isolamento dos hipocampos, os mesmos foram fatiados em um fatiador do tipo “*Mc Ilwain tissue slicer*” (figura 11), obtendo-se fatias de 400  $\mu\text{m}$  de espessura.<sup>57</sup> Cálculos de difusão de oxigênio sobre o tecido mostram que as fatias devem ter essa espessura. As fatias foram imediatamente transferidas para a câmara de perfusão para descanso, a qual era sempre preenchida com solução de ACSF normal e mantida à temperatura e oxigenação constantes. Após cerca de 40 minutos de perfusão as fatias foram transferidas para a câmara de interface, para registro das atividades epileptiformes. As fatias

foram colocadas sobre uma membrana (0.4  $\mu\text{M}$  *Millicell culture plate inserts*; *Millepore, Bedford, MA, USA*) e inicialmente perfundidas com solução de ACSF normal (em mM: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5  $\text{MgSO}_4$ , 1.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 10 glicose; pH equilibrado em 7,4 com oxigenação). Posteriormente a solução foi trocada por uma segunda solução alterada (em mM: 127 NaCl, 7 KCl, 1.5  $\text{MgSO}_4$ , 1.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 0  $\text{CaCl}_2$ , 10 glicose). O alto  $\text{K}^+$  necessário para gerar a excitabilidade do tecido e o zero  $\text{Ca}^{2+}$  para bloquear as conexões sinápticas.



**Figura 11** – Fatiador do tipo “*Mcllwain tissue slicer*” (vista superior). Os hipocampus foram posicionados na mesa móvel formando ângulos de  $70^\circ$  entre a lâmina presa a uma extremidade da haste (linhas tracejadas) e a fímbria do hipocampo. Em cada corte, o parafuso micrométrico foi girado para um avanço de  $400\ \mu\text{m}$ .

#### 4.5 SOLUÇÕES DE PERFUSÃO

Para a sustentação das atividades metabólicas do tecido foi utilizada ACSF normal. A indução de atividades epileptiformes foi obtida elevando-se a concentração de  $\text{K}^+$  e zerando-se a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  (ACSF Zero  $\text{Ca}^{++}$  alto  $\text{K}^+$ ). (Tabela 3).

**Tabela 3 – Composições das soluções de perfusão nos experimentos com fatias de hipocampus de rato (concentrações em mM)**

<b>ACSF Normal</b>	<b>ACSF Zero Ca<sup>++</sup> + K<sup>+</sup></b>	<b>ACSF Zero Ca<sup>++</sup> + K<sup>+</sup> + Br<sup>-</sup></b>
NaCl (127)	NaCl (127)	NaCl (*) NaBr (*)
KCl (2)	KCl (7)	KCl (7)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,1)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,1)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,1)
NaHCO <sub>3</sub> (26)	NaHCO <sub>3</sub> (26)	NaHCO <sub>3</sub> (26)
D-GLICOSE (10)	D-GLICOSE(10)	D-GLICOSE (10)
MgSO <sub>4</sub> (1,5)	MgSO <sub>4</sub> (1,5)	MgSO <sub>4</sub> (1,5)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (2)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (0)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (0)

\* Substituição equimolar dos íons Cl<sup>-</sup> e Br<sup>-</sup>

O Br<sup>-</sup> foi aplicado por substituição nas seguintes concentrações: 5, 7, 9 e 11 mM de NaCl por 5, 7, 9 e 11 mM de NaBr.

O bloqueador de canais de cloreto voltagem dependentes SITS (ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeno-2,2'-dissulfônico) foi dissolvido em ACSF 0-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup> a uma concentração final de 1mM e aplicado por perfusão.

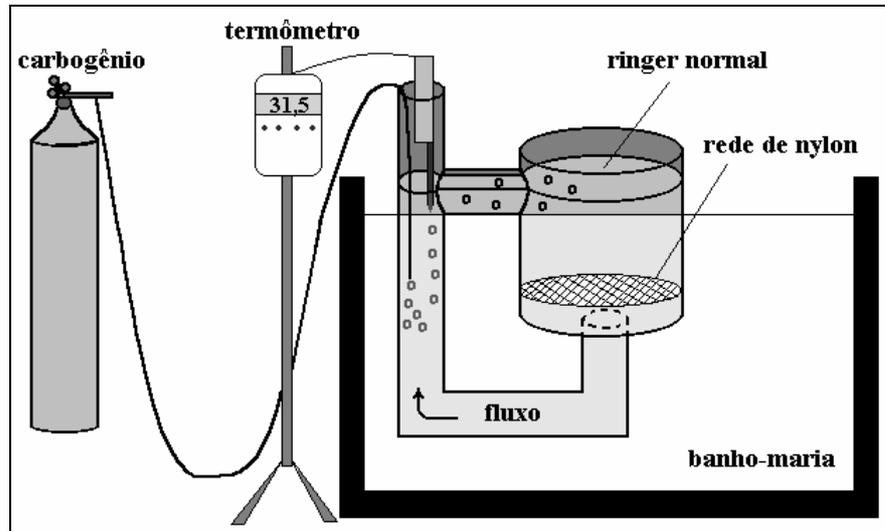
Para evitar floculação, o pH foi ajustado para 7,4, através de borbulhamento com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), antes da adição de sais contendo íons divalentes.

## **4.6 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO - EQUIPAMENTOS**

### **4.6.1 Câmara de perfusão**

A câmara de perfusão tem como função manter em descanso as fatias, preservando-as de lesões de excitotoxicidade, comuns após o procedimento de corte. A câmara foi fabricada no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional da Universidade Federal de São João Del Rei (LANEC-UFSJ) e é constituída de conexões e tubos em PVC, que são estruturados em forma de U (figura 12). As fatias descansam em uma rede de nylon, que fica situada no ramo com maior diâmetro. Todo o sistema é preenchido com ACSF normal (em mM: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glicose, pH equilibrado em 7.4, através de constante oxigenação (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> ). Através do borbulhamento com carbogênio, também é estabelecido um fluxo de solução que permite uma perfusão suave e adequada das fatias, sempre as mantendo em descanso sobre a rede de nylon.

Através do banho-maria, a câmara de perfusão permanece com temperatura controlada de aproximadamente de aproximadamente 31,5° C. As fatias foram armazenadas nesta câmara por pelo menos 40 minutos).



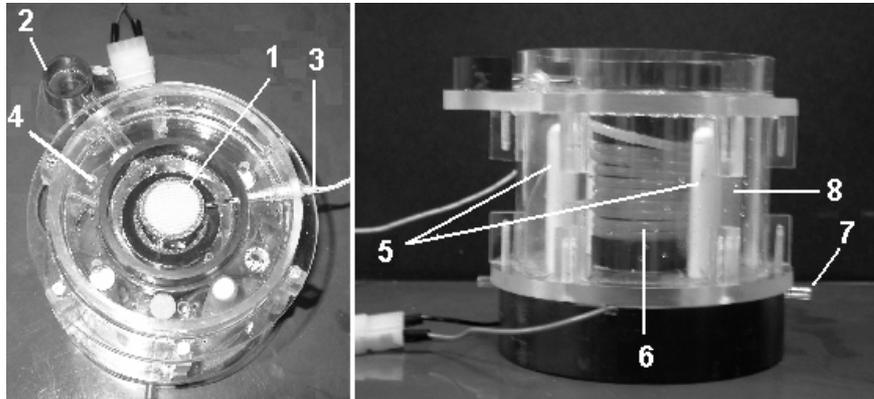
**Figura 12** – Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com ACSF normal, mantida a temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon.

#### 4.6.2 Câmara de interface

Após o tempo determinado de descanso na câmara de perfusão, as fatias foram transferidas para outra câmara, chamada câmara de interface. Essa câmara de interface foi construída, também no LANECS-UFSJ, especialmente para este trabalho, em material acrílico transparente e tubos de PVC, como mostrado na figura 13. Consiste de dois compartimentos: a cuba, que é a parte superior da câmara (mostrada à esquerda por uma visão superior), e o banho-maria, que consiste da parte inferior (apresentada com detalhes à direita através da vista lateral).

A cuba é composta por três cilindros, sendo dois de PVC e um, o exterior, de acrílico transparente. Possui também uma base em acrílico transparente, a qual é acoplada à parte superior do banho-maria. O cilindro central delimita com o intermediário um compartimento que é preenchido com a solução de banho, que pode ser ACSF normal ou outra solução alterada, dependendo do experimento. As fatias foram depositadas sobre o cilindro central (figura 13. 1). Neste cilindro é colocada uma membrana (0.4  $\mu\text{m}$  Millicell

*culture plate inserts; Millipore, Bedford, MA, USA*) que fica transparente quando perfundida na solução.



**Figura 13** – Câmara de interface. Sendo, à esquerda, vista superior mostrando em detalhe a constituição da cuba. Em 1, está o local onde as fatias foram depositadas; em 2, o recipiente por onde é controlado o nível da solução de banho das fatias; em 3, o termômetro responsável pelo controle da temperatura da solução de banho das fatias; e, em 4, os orifícios por onde chega o oxigênio na câmara. E, à direita, a vista lateral mostrando o banho-maria. Em 5, são mostradas duas das quatro resistências envolvidas em invólucros de vidro; em 6, o tubo enrolado no cilindro central por onde passa a solução de banho aquecida; em 7, o local por onde o carbogênio chega na câmara; e em 8, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara.

Ainda na câmara de interface, o nível da solução é controlado através de sucção, utilizando uma bomba de vácuo de diafragma. Através do recipiente isolado e vaso comunicante (figura 13.2), é controlada a altura da solução de banho que mantém as fatias na interface solução de ACSF Normal / oxigênio umidificado. O oxigênio chega na cuba através de perfurações que se encontram entre o cilindro de acrílico mais externo e o cilindro de PVC intermediário (figura 13.4).

O banho-maria é composto de 4 resistências ( $5 \Omega$ , 20 W) ligadas em paralelo e encerradas em invólucros de vidro. Duas delas são vistas na figura 13, indicadas pelo número 5. As resistências são alimentadas com tensões contínuas até 12 V, permitindo o aquecimento da água destilada dentro da câmara. As tensões são controladas via um software desenvolvido por CARVALHO (2003) em plataforma LABVIEW 6.1 (NATIONAL INSTRUMENTS). A intensidade da tensão é calculada de acordo com a temperatura desejada através de um módulo de controle eletrônico. Esse módulo é comandado por meio de uma placa AD/DA (modelo PCI-6071E – NATIONAL INSTRUMENTS) em conjunto com o software. O equipamento é capaz de manter temperaturas constantes em torno de  $34^{\circ} \text{C}$ , com precisão de

um décimo de grau. A água contida no banho-maria aquece as paredes do tubo, enrolado ao cilindro central no interior do recipiente (figura 13.6), que conduz a solução para a cuba, permitindo a perfusão das fatias com a temperatura da solução devidamente controlada. Tubos de plástico conduzem o carbogênio ao interior do banho-maria (figura 13.7) para ser distribuído, por meio de borbulhadores (figura 13.8), dentro da água. Assim, o carbogênio é aquecido e umidificado para, a seguir, ser direcionado sobre a face superior das fatias mantidas na cuba.

Uma tampa em forma de disco encobre o ambiente em torno das fatias, permitindo uma melhor oxigenação e contribuindo para homogeneizar a temperatura no interior da cuba. A tampa contém um orifício central que permite a inserção do eletrodo para o registro do potencial elétrico, bem como a exaustão do carbogênio. Problemas de precipitação de gotas de condensado, formadas na superfície do disco e na ponta do eletrodo de medição, são muito comuns. Mas, isso pode ser solucionado através da cobertura dos mesmos com papel de filtro.

Na câmara de interface, as fatias foram posicionadas sobre a membrana, situada na interface – líquido de perfusão / carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) umidificado. Na primeira hora, a perfusão foi feita com ACSF normal. A seguir, a perfusão foi trocada para uma segunda solução alterada (ACSF 0- Ca<sup>++</sup> e alto K<sup>+</sup>).

#### **4.6.3 Registro do Potencial Elétrico Extracelular (PE) e Sinal Óptico Intrínseco (IOS)**

Para aquisição dos sinais do potencial elétrico extracelular (PE), foi utilizado um eletrodo formado por filamentos de prata e micropipeta de vidro (modelo THINWALL, TW150F-3 – WPI). A pipeta foi estirada em um puxador de pipetas (modelo DMZ UNIVERSAL PULLER – ZEITZ-INSTRUMENTS) e preenchida com solução de NaCl 1,0 M, com resistência final de 5 a 10 MΩ, suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído. Os filamentos de prata foram cloretados (numa fonte de corrente contínua) para se evitar o efeito de bateria provocado pela acumulação de cargas na interface metal-líquido. Após cloretado, o eletrodo foi conectado a uma headstage (modelo AI 402 x 50, ULTRALOW NOISE AMPLIFIER – AXON INSTRUMENTS) interligada a um amplificador (modelo CYBERAMP 380 – AXON INSTRUMENTS) para a aquisição do sinal. O programa SAE (Sistema Auxiliar de Experimentos), desenvolvido no LANEC (SILVA, 2000), foi utilizado para controle do amplificador, digitalização, exibição em tempo real e armazenamento em arquivos. A amostragem do sinal foi feita na taxa de 10.000 amostras por segundo, o sinal é

amplificado 500 vezes e foi utilizado um filtro para redução do ruído de fundo. O processamento do sinal foi feito off-line. O programa MATLAB 6.5 (MATHWORKS) é utilizado como saída gráfica. O computador empregado na aquisição e processamento dos sinais é um Pentium III de 1 GHz e 512 MB de RAM.

Um microscópio estereoscópico (modelo NIKON – SMZ 1500), com capacidade de ampliação de 112.5 vezes, foi utilizado para visualizar as fatias pelo método de luz transmitida. No intuito de manter a câmara de interface fixa, a montagem do microscópio foi feita sobre uma mesa XY, independente da câmara, permitindo ajustar o campo visual, sem mover a câmara. Dessa forma, o microscópio varre toda a extensão da membrana onde se encontram as fatias, permitindo uma melhor visualização de suas camadas, sem o inconveniente de deslocar o eletrodo, quando da mudança do campo visual.

Uma luz gerada na parte inferior do microscópio, abaixo da câmara de interface, atravessava esta, atingia as fatias e permitia uma melhor visualização das camadas. O posicionamento do eletrodo sobre o tecido foi feito com o auxílio de um micro-manipulador mecânico (modelo KITE-L – WPI), permitindo a inserção do eletrodo na fatia e na posição de interesse (no caso, o giro denteado), com o mínimo de lesão.

Para minimizar as vibrações mecânicas durante os experimentos, utiliza-se uma mesa anti-vibração, que consiste em um tampo de pedra suspenso por câmaras de ar, onde são dispostos os equipamentos. As câmaras de ar permitem ajustar o nível de trabalho da mesa. No intuito de isolar os equipamentos de possíveis interferências eletromagnéticas, a mesa é envolvida por uma gaiola de Faraday.

A captura das imagens, para obtenção do sinal óptico intrínseco, contou com a seguinte montagem experimental: a luz branca, gerada na parte inferior do microscópio por uma lâmpada (PHILIPS – *Projection Lamp*, 6 V e 20 ou 30 W), passava por dentro da câmara de interface e atingia a fatia do hipocampo. Uma binocular acoplada à câmara de CCD (modelo COOLSNAP PROcf) foi responsável pela captação da luz transmitida (luz que atravessa a fatia). As imagens captadas pela câmara de CCD foram gravadas em fitas de vídeo, por meio de um vídeo cassete (PHILCO – Hi-Fi Stereo, 7 head) conectado a uma televisão (LG – modelo CP-14K40). A taxa de amostragem do vídeo é de 30 imagens por segundo.

Para observar as AE, o ganho do microscópio foi ajustado de forma que o giro denteado da fatia preencha o máximo possível o campo visual. Para os diversos ganhos do microscópio, foram registradas imagens de uma régua graduada para determinar a densidade de *pixels* por mm. Na Figura 14, está representado o conjunto acima descrito.



**Figura 14** – Equipamentos utilizados para obtenção do registro simultâneo do PE e do IOS durante as AE em fatias do hipocampo. 1- Amplificador CYBERAMP 380 para amplificação do sinal elétrico; 2- “Setup” para registro do potencial elétrico extracelular; 3- Pré-amplificador (Headstage modelo AI 402 x 50) para aquisição dos sinais e foi interligada a um amplificador biológico; 4- Microscópio estereoscópico (modelo NIKON – SMZ 1500) para visualização das fatias e obtenção do IOS; 5- Imagem do sinal óptico intrínseco obtida na tela do microcomputador através do programa Matlab 6.5 (Imagem VET\_online).

O PE foi registrado a partir do posicionamento do eletrodo de registro no GD. O eletrodo foi conectado a uma headstage por meio de um holder. A headstage foi interligada a um amplificador biológico. Os sinais foram armazenados em um computador. Para o registro do IOS, as fatias foram iluminadas pela luz gerada na base do microscópio. Uma binocular acoplada à câmara de CCD captura a luz transmitida. As imagens foram gravadas em fitas de vídeo para posterior processamento das imagens espaço temporal.

## 4.7 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR E DO IOS

### 4.7.1 Potencial Elétrico Extracelular (PE)

Para o potencial elétrico extracelular foi feita uma análise quantitativa dos parâmetros amplitude da componente DC (variação negativa da linha de base do sinal elétrico

extracelular em mV), amplitude das populações de espículas (mV), duração dos eventos de AE(s), intervalo entre eventos (s), antes, durante e após aplicação do brometo de sódio.

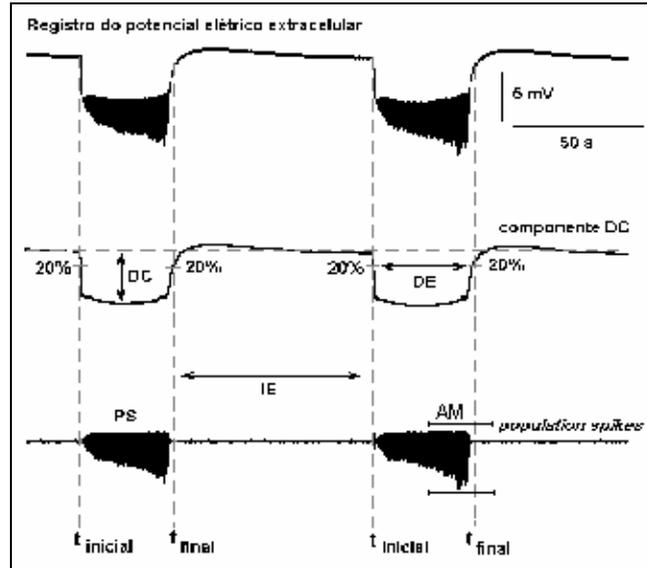
Para a obtenção desses parâmetros foi aplicado, como ferramenta, a transformada discreta de Fourier e a inversa no sinal do potencial elétrico extracelular, utilizando o programa MATLAB, versão 6.5.

Para separar as componentes DC das populações de espículas, cujas componentes juntas formam eventos epileptiformes ou DS, foi aplicado a transformada discreta de Fourier no sinal. Assim, foi possível filtrar a frequência baixa, abaixo de 10 Hz, que corresponde à componente DC. O sinal acima de 10 Hz, cujas componentes têm frequência alta, corresponde aos PS's. Fazendo a transformada inversa, foi obtido o sinal contendo apenas a componente DC, livres dos PS's. Após a obtenção da componente DC, a linha de base foi determinada (linha pontilhada na horizontal, figura 15) através da média de um trecho do potencial elétrico antes do evento. Assim, a amplitude da componente DC foi obtida como sendo a variação máxima do sinal em relação à linha de base.

Para o cálculo da amplitude dos PS's foi feita a subtração do sinal completo, pelo sinal contendo apenas a componente DC. Dessa forma, obteve-se apenas o sinal correspondente a frequência alta, indicado pelos PS's. Feito isso, calculou-se o seu módulo e depois a integral resultando na obtenção dos valores da contribuição dos PS's durante os *bursts* epileptiformes.

A duração dos eventos foi calculada após a determinação da linha de base, da componente DC e da variação dos instantes " $t_{\text{final}}$ " e " $t_{\text{inicial}}$ " durante a descarga em salva (DS). Sendo que, o tempo " $t_{\text{inicial}}$ " foi considerado quando o sinal atinge uma variação de 20 % da amplitude máxima da componente DC e, o tempo " $t_{\text{final}}$ " quando o sinal retorna a 20 % dessa amplitude máxima, ambos em relação à linha de base.

O intervalo entre eventos foi obtido pela distância entre o instante em que ocorre o fim de um evento, " $t_{\text{final}}$ " e o instante em que se inicia o próximo evento, " $t_{\text{inicial}}$ ".



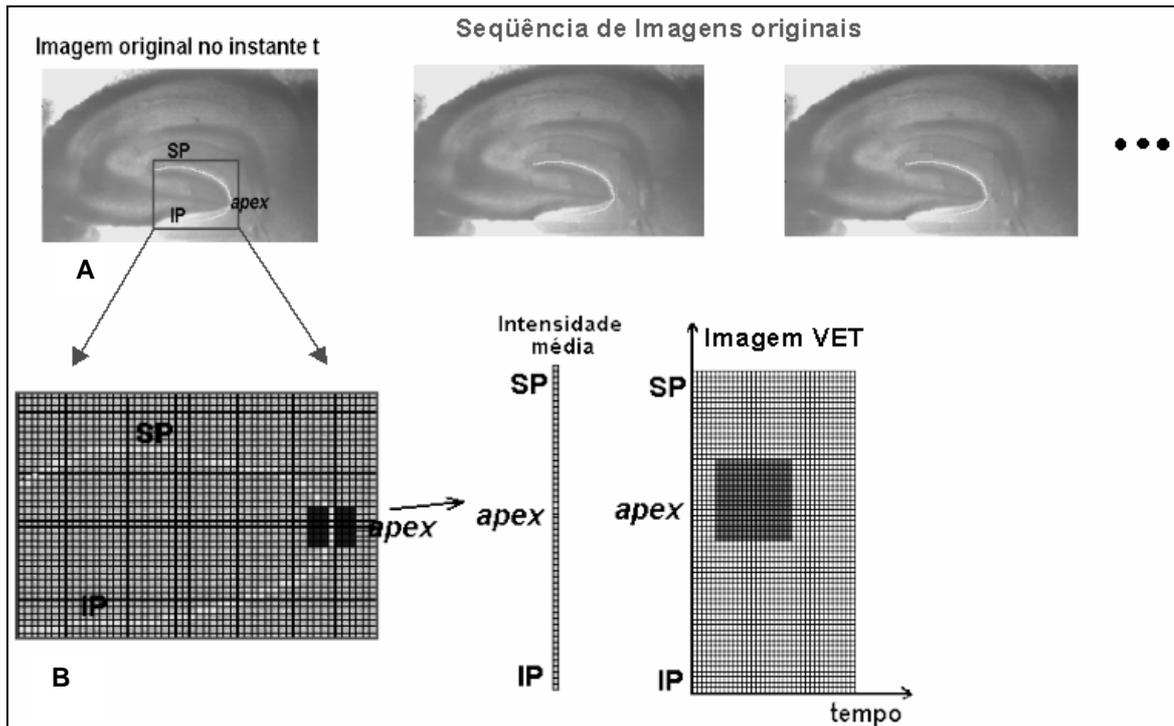
**Figura 15** – Procedimento para a obtenção dos parâmetros do potencial elétrico extracelular. As siglas IE, DE, DC e PS representam o intervalo entre eventos, a duração dos eventos, a componente DC, PS's, respectivamente.

#### 4.7.2 Sinal Óptico Intrínseco (IOS)

Para o processamento e extração dos IOS, foi usado o registro simultâneo do PE que permite identificar os trechos das seqüências de imagens correspondentes aos *bursts*.

As imagens foram capturadas numa taxa de amostragem de 30 Hz, a uma resolução de 640×480 pixels. Durante as medidas, as imagens foram gravadas através de um videocassete, registradas em fitas VHS. O processo de digitalização envolveu uma placa digitalizadora de vídeo, DC10 Plus, gerenciada pelo programa *Pinnacle Studio* – versão 8.10. Esse programa salva a seqüência de quadros em formato *AVI*. Posteriormente, os quadros foram extraídos no formato *JPEG*, com o auxílio programa *Fast Movie Processor*, versão 1.41. No formato *JPEG*, essas imagens foram gravadas em CD's, para posterior processamento.

Com o objetivo de condensar as informações contidas numa seqüência de imagens, referentes as atividades epileptiformes, foi adotado um procedimento, já desenvolvido por PEREIRA e colaboradores, (2005), que sintetiza todas essas informações numa imagem única denominada imagem da variação espaço-temporal ou imagem VET. O procedimento do cálculo da imagem VET inicia com um traçado de uma poligonal ao longo da camada granular do GD, como é exemplificado pela curva em branco (figura 16).



**Figura 16** – Esquema do procedimento utilizado para obter a imagem espaço-temporal (imagem VET) durante as atividades epileptiformes na camada granular do GD. A- imagem de uma fatia do hipocampo onde é mostrada uma poligonal (curva branca) traçada sobre a camada granular do giro denteado. B- diagrama esquemático da ampliação do giro denteado que representa o conjunto de pixels (quadrados pequenos) que formam a imagem. Os pixels em branco correspondem aos pixels da poligonal da parte A. Os pixels em cinza escuro constituem a região quadrada que foi utilizada para calcular as intensidades médias dos pixels varrendo toda a poligonal. Essa região quadrada é sempre centrada em cada pixel da poligonal (por exemplo, pixel em preto). A partir de cada imagem correspondente a cada instante de tempo, foi construída uma coluna, utilizada para a construção da imagem VET, possuindo as intensidades médias de luz ao longo de toda a camada granular. O mesmo procedimento é utilizado para a poligonal em qualquer outra camada da fatia.

A camada granular foi escolhida uma vez que, segundo CARVALHO (2005), essa camada apresenta uma maior variação na intensidade do IOS durante as atividades epileptiformes não-sinápticas. Uma vez levantada a poligonal para cada imagem da sequência foram calculadas as intensidades médias de luz dos pixels contidos nos sítios no entorno dessa poligonal (pixels cinza escuro). Essas intensidades médias de luz foram subtraídas dos valores correspondentes da imagem controle (imagem antes de acontecer os eventos epileptiformes). Após normalizar essa diferença em relação a imagem controle, os valores foram dispostos em uma coluna a qual foi feita uma retificação da poligonal, preservando a mesma métrica. Cada coluna que se refere a retificação da poligonal, em cada instante de tempo foi disposta lado à lado respeitando a ordenação temporal das imagens referentes aos eventos epileptiformes. Com essa imagem foi possível visualizar qual a região do GD está ocorrendo AE.

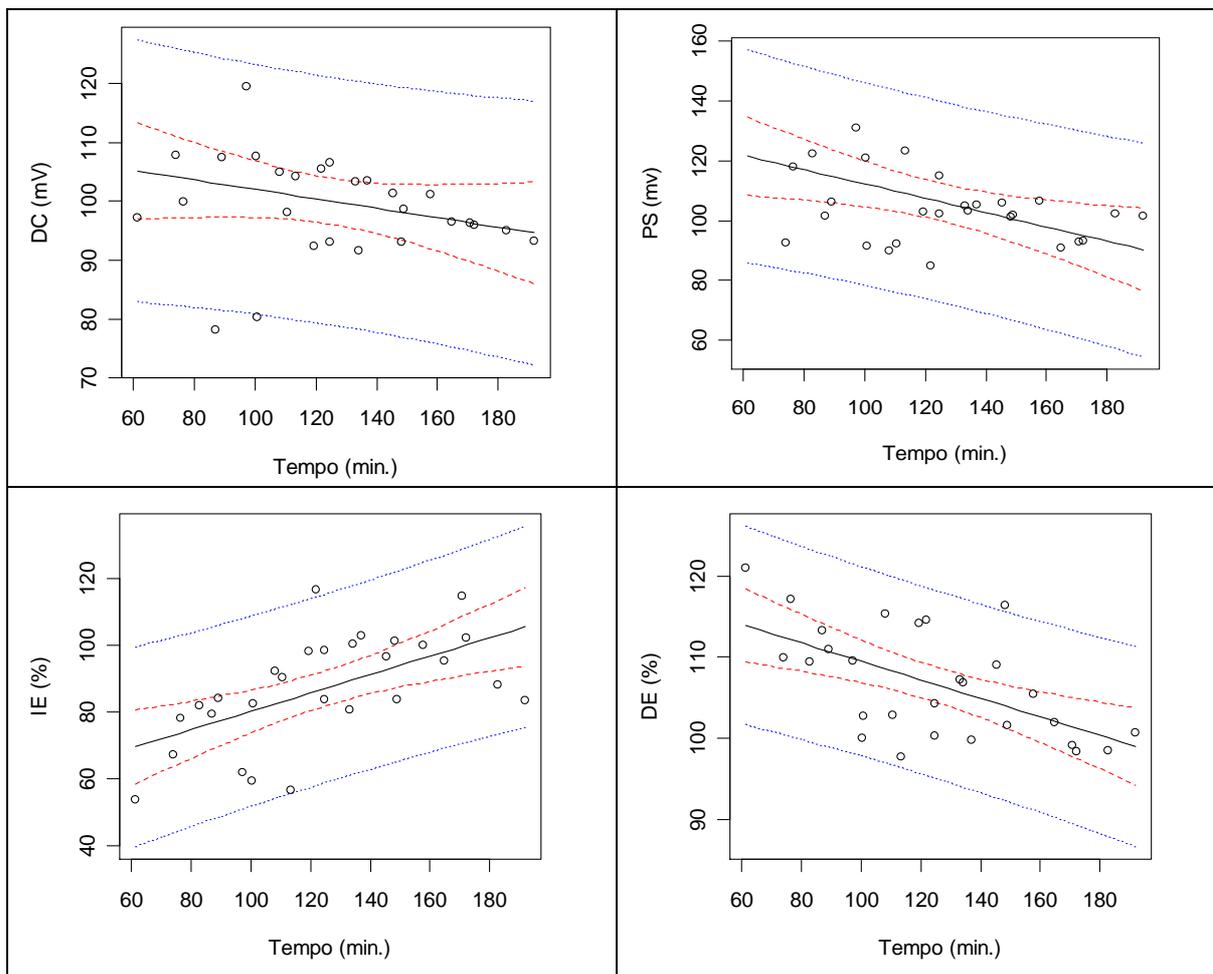
## 5 RESULTADOS

### 5.1 POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR

#### GRUPO CONTROLE

No grupo controle ( $n=3$ ), foi induzida atividade epileptiforme com ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$ , e registraram-se os eventos ao longo do tempo (120 minutos) nestas fatias, desde o momento do início da perfusão com esta solução até o momento término destas atividades. Foram medidos os eventos (DS) a cada 10 minutos e utilizou-se a análise de regressão linear simples.

Esta análise permitiu verificar as alterações das variáveis DC, DE, IE e PS. DC, IE e DE diminuíram semelhante; PS aumentou ao longo do tempo (figura 17). Observa-se que nos registros com NaBr, ao retornar com a solução ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$ , a atividade epileptiforme reapareceu a maioria similares aos de registros controles.



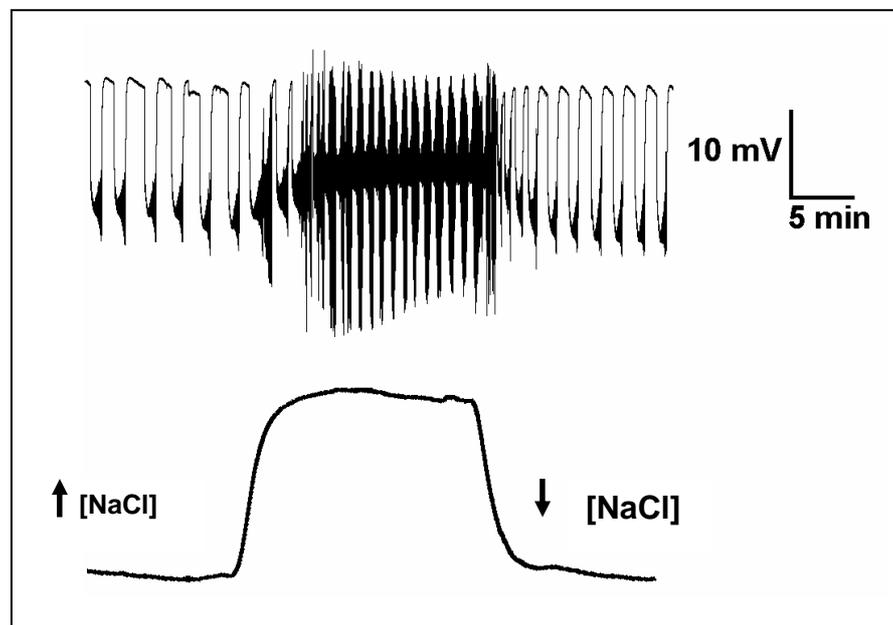
**Figura 17** – Gráficos dos parâmetros (DC, DE, IE e PS) dos registros controles analisados durante 120 minutos (60 à 180 minutos).

## GRUPO NaBr

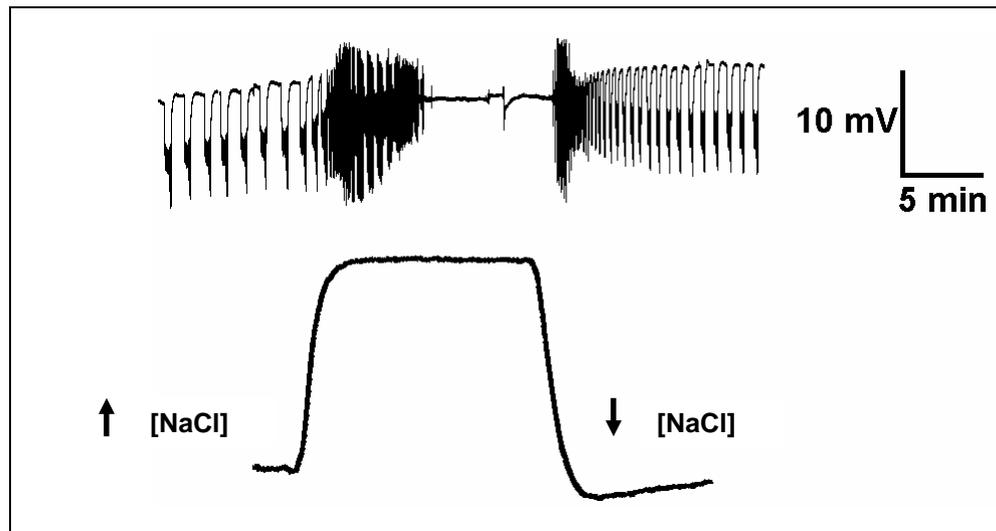
A atividade epileptiforme foi induzida na camada granular do giro denteado com ACSF 0-  $\text{Ca}^{++}$  e com alto  $\text{K}^+$ . Mudanças na  $[\text{K}^+]$ , levaram ao aparecimento de atividades tipo descargas em salva sincronizadas. As descargas em salva (DS) foram caracterizadas pelo decaimento da linha de base superposto pelas populações de espículas com grande amplitude.

As fatias hipocâmpais foram incubadas com ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$  e com alto  $\text{K}^+$ . O surgimento das AE espontâneas iniciou-se após aproximadamente 40 min de perfusão. Posteriormente, perfundiu-se com brometo de sódio por 20 minutos para avaliar sua atividade antiepiléptica, *in vitro*. O NaBr suprimiu as AE e foi reversível com a reperfusão com ACSF 0-  $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$ .

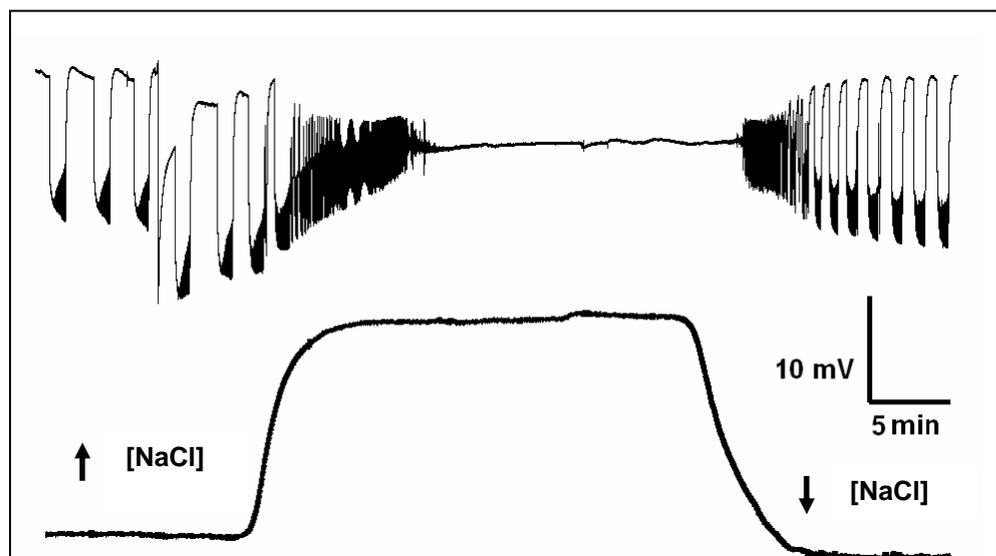
Foram realizados n=23 registros com brometo de sódio. Destes obteve-se 5 registros para concentração 5mM de NaBr (figura 18) e 6 registros para as concentrações 7 (figura 19), 9 (figura 20) e 11mM (figura 21). Após cada registro foi realizado uma curva com alta e baixa concentração de NaCl simulando o registro.



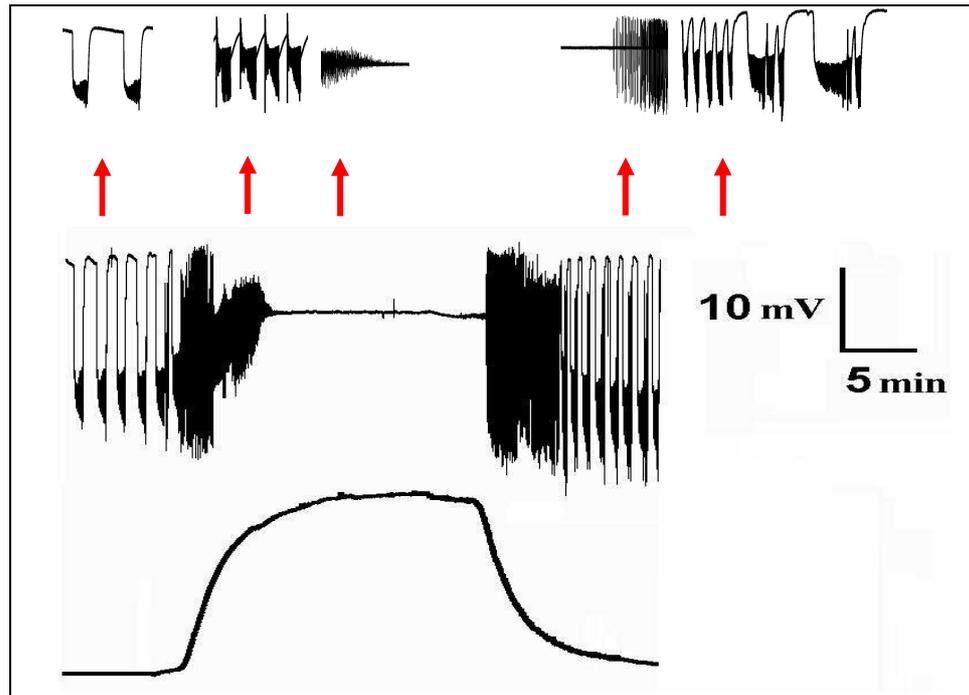
**Figura 18** – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.



**Figura 19** – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 7mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.



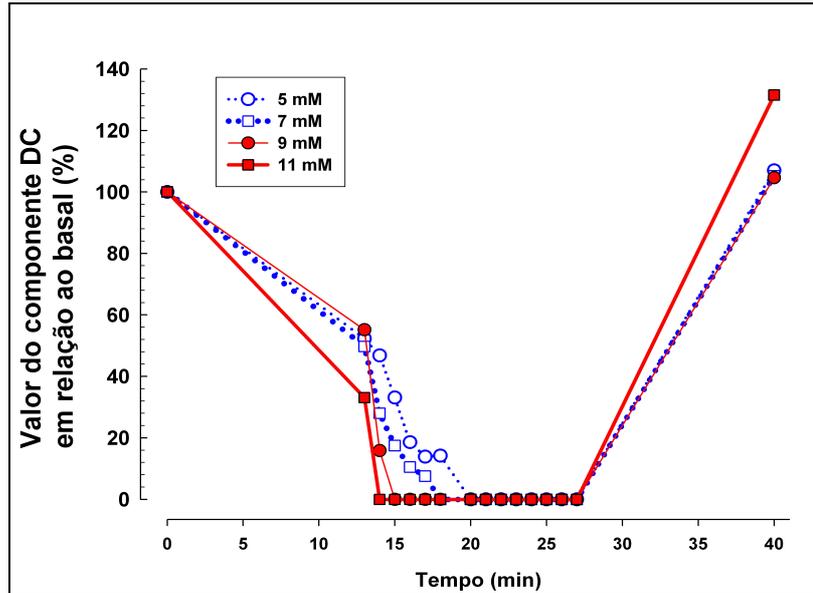
**Figura 20** – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 5 semanas submetido ao NaBr 9 mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.



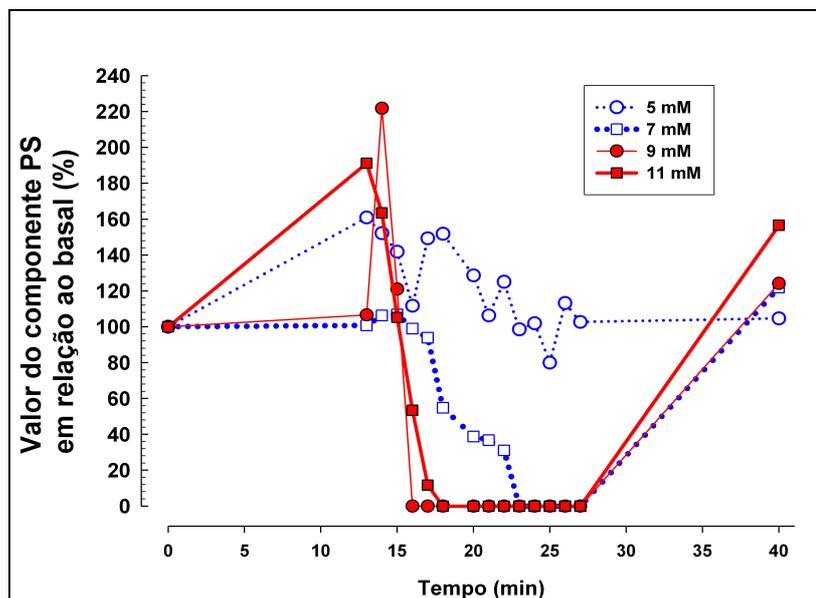
**Figura 21** – Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 5 semanas submetido ao NaBr 11 mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.

A análise dos registros extracelulares com NaBr consistiu da medida de 6 descargas em salva (tempo basal) durante a perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup>; num segundo momento com perfusão com NaBr 5, 7, 9, 11mM, analisou-se a partir do início do efeito do NaBr (mediu-se os eventos durante tempo de 20s, intervalo de 50s, durante ~14min);. Retornou-se a perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup> e analisou-se 6 eventos após a manobra com o brometo, esperou-se o retorno das atividades ao normal para medir estes eventos.

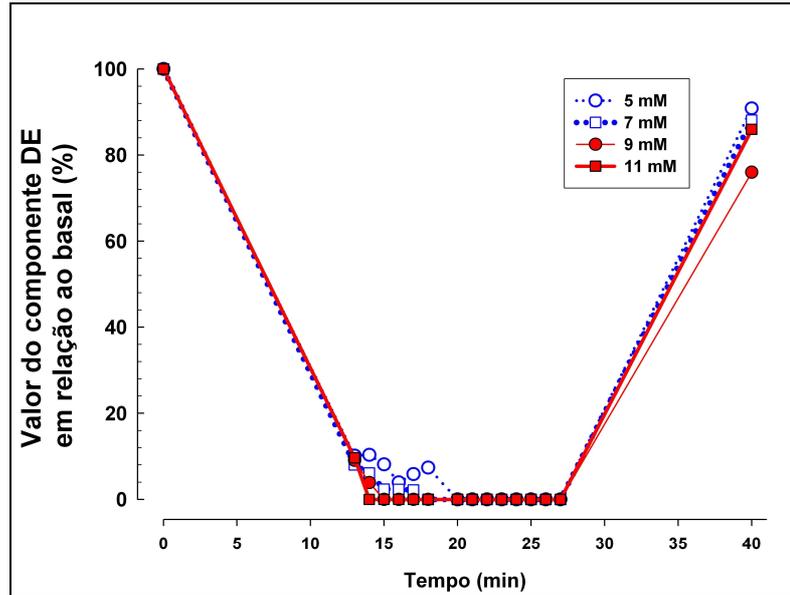
Com a perfusão com solução NaBr (7, 9, 11 mM) observaram-se mudanças como redução da amplitude da componente DC (gráfico 22), aumento transitório das amplitudes das populações de espículas (do inglês *population spikes*) (gráfico 23); reduções da duração (gráfico 24) e intervalo entre eventos (gráfico 25), seguidos da redução das descargas em salva (DS) até completa supressão. A aplicação de cinco mM de NaBr não suprimiu as AE, mas reduziu: a amplitude da componente DC, o intervalo entre eventos e a duração dos eventos. Não houve alteração da amplitude dos PS's nesta concentração de NaBr.



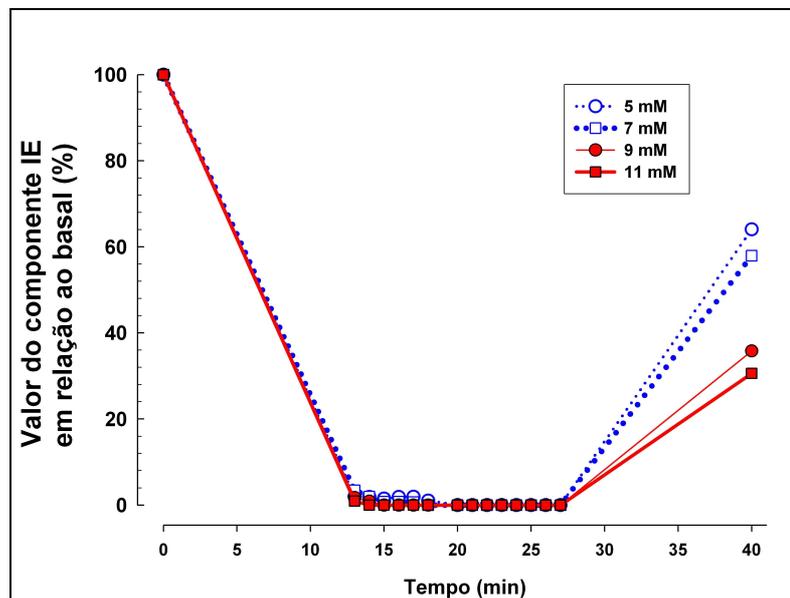
**Figura 22** – Gráfico referente aos valores da componente DC (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DC normalizada. Observou-se queda de DC em relação ao basal em 4 concentrações empregadas (5, 7, 9 e 11mM), valor mínimo em 14 minutos concentração de 9 e 11mM e aos 18min as concentrações de 5 e 7 mM.



**Figura 23** – Gráfico referente aos valores do PS (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente PS normalizada. Observou-se queda de PS em relação ao basal em 4 concentrações empregadas (5, 7, 9 e 11mM), valor mínimo em 16 minutos para a concentração de 9mM, 18min para a concentração de 11mM e 23 min para a concentração de 7 mM. Não houve alteração significativa com 5mM.



**Figura 24** – Gráfico referente aos valores da DE (%) em relação ao T basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DE normalizada. Observou-se queda da DE em relação ao basal nas 4 concentrações empregadas (5, 7, 9 e 11mM) aos 14 minutos para todas as concentrações.



**Figura 25** – Gráfico referente aos valores do IE (%) em relação ao t basal. Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada. Observou-se queda de IE em relação ao basal nas 4 concentrações empregadas (5, 7, 9 e 11mM), chegando ao valor mínimo em 13 minutos para todas as concentrações.

Foram mensurados os valores de cada variável nos seguintes tempos:  $t_0$ , tempo antes da aplicação do NaBr ( $t$  basal);  $t_1$  (13min) a  $t_{14}$  (28min): exposição ao efeito do NaBr

(concentração de 5, 7, 9, 11mM) e aos 40 min (t15) re-perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup>. Foram utilizados os valores das medianas e estes foram normalizados. Analisamos as alterações dos parâmetros DC, DE, IE e PS antes, durante e após a perfusão com NaBr. Com a perfusão do ACSF 0- Ca<sup>++</sup> e alto K<sup>+</sup> encontramos DC com grande amplitude (4,5-12 mV), duração dos eventos no mínimo 34,10s- 60,6s, intervalo entre eventos 36,0- 81,1s e amplitude dos *bursts* entre 0,2 a 0,7 mV (tabela 4). O efeito do NaBr apareceu aproximadamente 5 minutos após o início da aplicação.

A comparação das distribuições do grupo NaBr em cada um dos tempos (ponto a ponto) pelo teste de Kruskal Wallis não foi estatisticamente significativa à exceção do grupo 5 que foi diferente dos outros grupos na variável PS no tempo 7 ( $p < 0,05$ , comparações múltiplas realizadas pelo teste post hoc de Tukey da variável normalizada).

Quando comparados as variáveis nos tempos 0 a 7 entre os grupos, não foi notada nenhuma diferença estatística entre os grupos, exceto na variável PS na qual o grupo 5 tende ao aumento enquanto que nos outros grupos tende a uma diminuição ( $P_{tempo} < 0,001$ ,  $P_{interação} < 0,001$ ,  $P_{grupo} < 0,001$ ).

**Tabela 4 – Tabela comparativa dos valores das variáveis entre os grupos ao longo do tempo.**

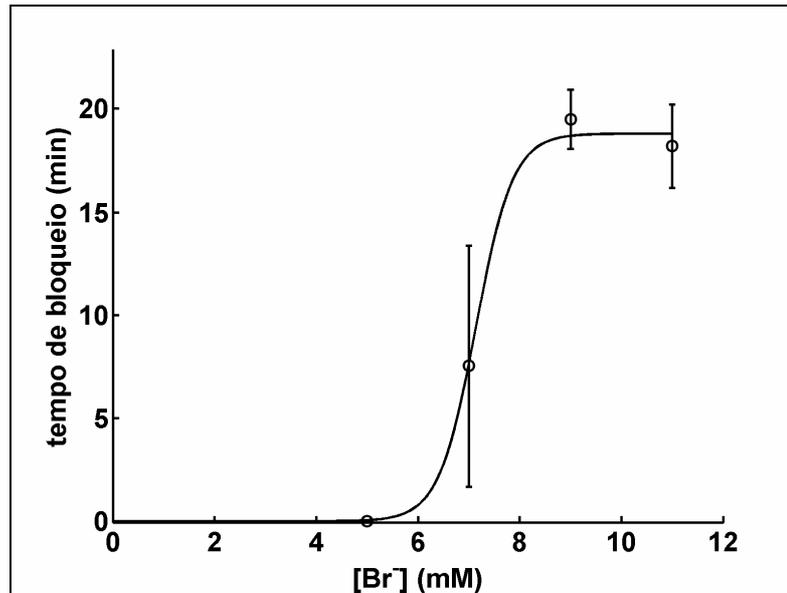
	Grupo 5			Grupo 7			Grupo 9			Grupo 11			Pt	Pi	Pg
	T0	T7	T15	T0	T7	T15	T0	T7	T15	T0	T7	T15			
DC	12,8 (4,5-15,2)	0 (0-0)	10,7 (5,6-16,4)	9,9 (3,3-14,0)	0 (0-2,2)	10,5 (3,7-13,7)	6,2 (2,2-13,0)	0 (0-0)	6,5 (2,0-14,2)	6,2 (4,4-15,9)	0 (0-0)	10,5 (4,7-18,8)	<0,001	<0,124	0,462
PS	0,4 (0,2-0,7)	0,3 <sup>a</sup> (0,3-0,6)	0,5 (0,4-0,7)	0,4 (0,2-0,9)	0,2 <sup>b</sup> (0,1-0,3)	0,4 (0,3-0,9)	0,2 (0,1-0,4)	0 <sup>b</sup> (0-0)	0,2 (0,1-0,6)	0,3 (0,2-0,6)	0 <sup>b</sup> (0-0)	0,6 (0,3-0,9)	<0,001	<0,001	0,010
IE	66,4 (36,0-81,1)	0 (0-2,4)	34,2 (27,7-51,9)	51,6 (37,4-63,4)	0 (0-0,9)	27,5 (25,8-42,4)	60,0 (40,2-92,8)	0 (0-0)	25,1 (14,0-44,3)	73,2 (52,0-89,4)	0 (0-0)	24,6 (10,0-39,3)	<0,001	<0,047	0,035
DE	47,8 (34,1-60,6)	0 (0-5,4)	45,5 (31,0-51,5)	33,5 (18,2-42,6)	0 (0-1,1)	28,3 (16,0-31,6)	39,3 (24,4-50,1)	0 (0-0)	32,0 (25,1-36,4)	40,2 (27,4-42,7)	0 (0-0)	30,3 (13,2-40,0)	<0,001	<0,504	0,366

Dados apresentados pela mediana (min-max). São apresentados os valores das significâncias (P tempo-Pt, P interação-Pi, P grupo-Pg) obtidos pelo teste ANOVA para medidas repetidas da variável normalizada.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam distribuições diferentes. A comparação das distribuições em cada um dos tempos (ponto a ponto) pelo teste de Kruskal Wallis não foi estatisticamente significativa a exceção do grupo 5 que foi diferente dos outros grupos na variável PS no tempo 7.

(P<0,05, comparações múltiplas realizadas pelo teste post hoc de Tukey da variável normalizada).

Com gráfico do tempo de bloqueio (min) x concentração (mM) foi demonstrado a supressão ou não das AE através da aplicação do NaBr nas quatro concentrações. Em 7mM teve supressão das atividades em 4 registros (n=6), 9mM e 11mM houve o bloqueio em todas as fatias. Na re-perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup> observou-se que a supressão das AE foi reversível. A resposta do NaBr foi concentração-dependente (figura 26).

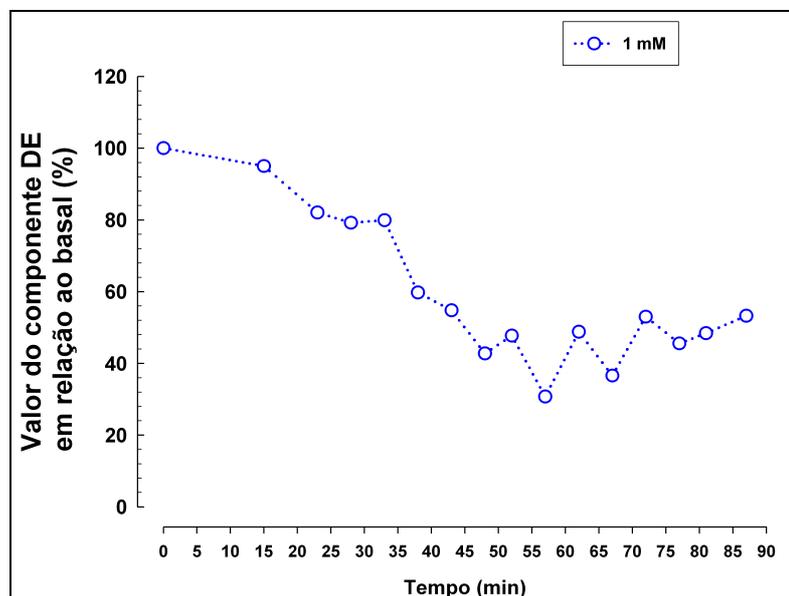


**Figura 26** – Gráfico da relação concentração-resposta (redução ou supressão das AE's pelo NaBr 5, 7, 9 e 11mM). Cada ponto representando a média dos registros extracelulares do potencial elétrico de cada concentração e a média dos tempos destes registros. Este gráfico mostra que na concentração de 7mM se tem um bloqueio das AE em quatro registros (n=6), 9mM é a concentração suficiente para a supressão das AE (n=6) e com 11mM existe uma saturação da resposta (n=6).

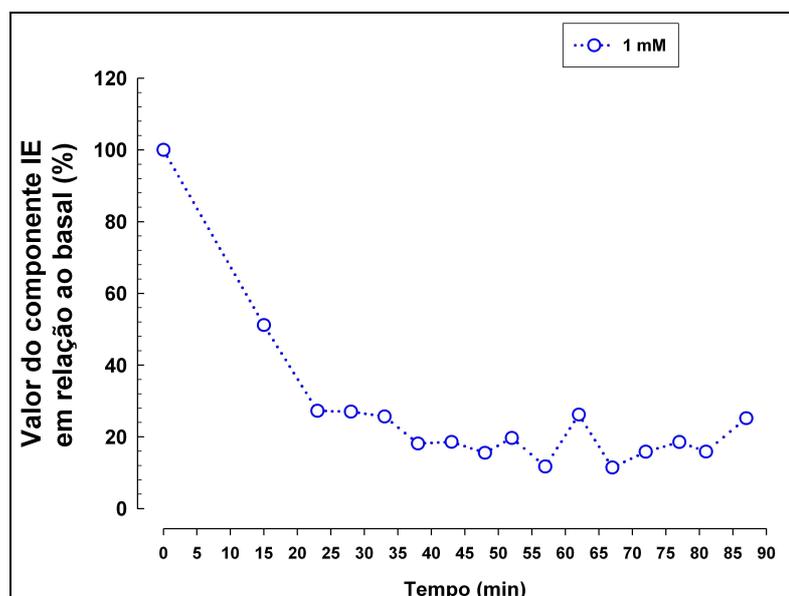
## GRUPO SITS

Os registros com o SITS foram realizados da mesma forma do NaBr. Perfundiu-se as fatias com ACSF livre de Ca<sup>++</sup> e com alto K<sup>+</sup> para induzir a AE. Posteriormente, perfundiu-se com ACSF 0- Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup> SITS por 20 a 30 minutos. Reperfundimos com ACSF 0- Ca<sup>++</sup> e com alto K<sup>+</sup>. O efeito do SITS não aconteceu próximo de sua aplicação e as mudanças nos registros começaram aproximadamente 15 minutos após sua perfusão. Os registros de potencial elétrico com SITS mostraram uma diminuição da duração dos eventos e intervalo entre eventos com uma pequena recuperação; a amplitude da componente DC com pouca alteração ao longo do registro e a amplitude dos PS'S mostrou uma diminuição. Ao comparar com o efeito do NaBr pode-se notar semelhança no PE para as variáveis DE

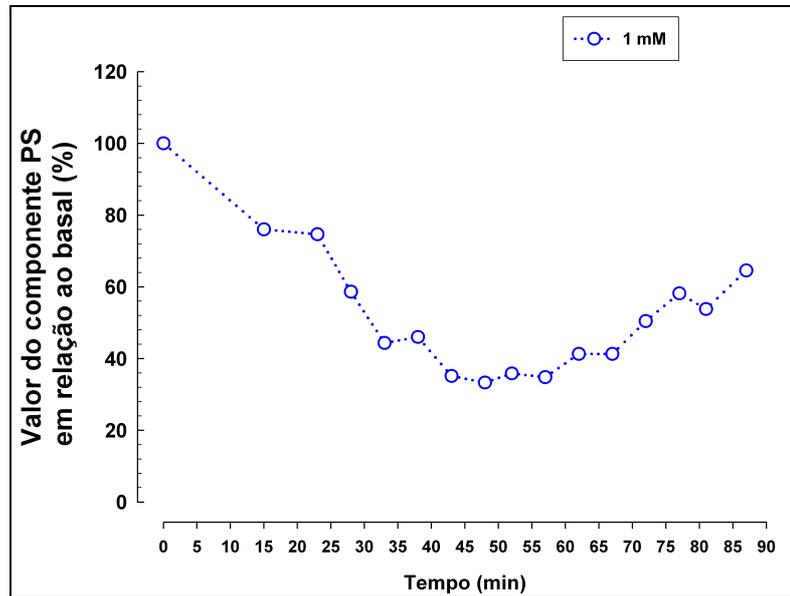
(Figura 27), IE (Figura 28) e PS (Figura 29). A variável DC não variou ao longo do tempo (Figura 30).



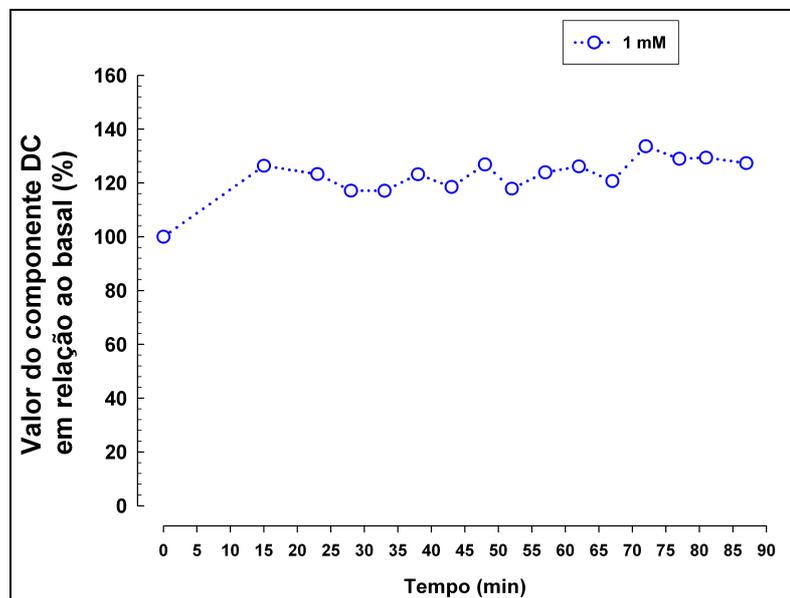
**Figura 27** – Gráfico do SITS referente aos valores do DE (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DE normalizada.



**Figura 28** – Gráfico do SITS referente aos valores do IE(%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada.



**Figura 29** – Gráfico do SITS referente aos valores do PS (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente IE normalizada.



**Figura 30** – Gráfico do SITS referente aos valores do DC (%) em relação ao T basal (T0). Cada ponto no gráfico representa os valores da mediana da componente DC normalizada.

## 5.2 SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

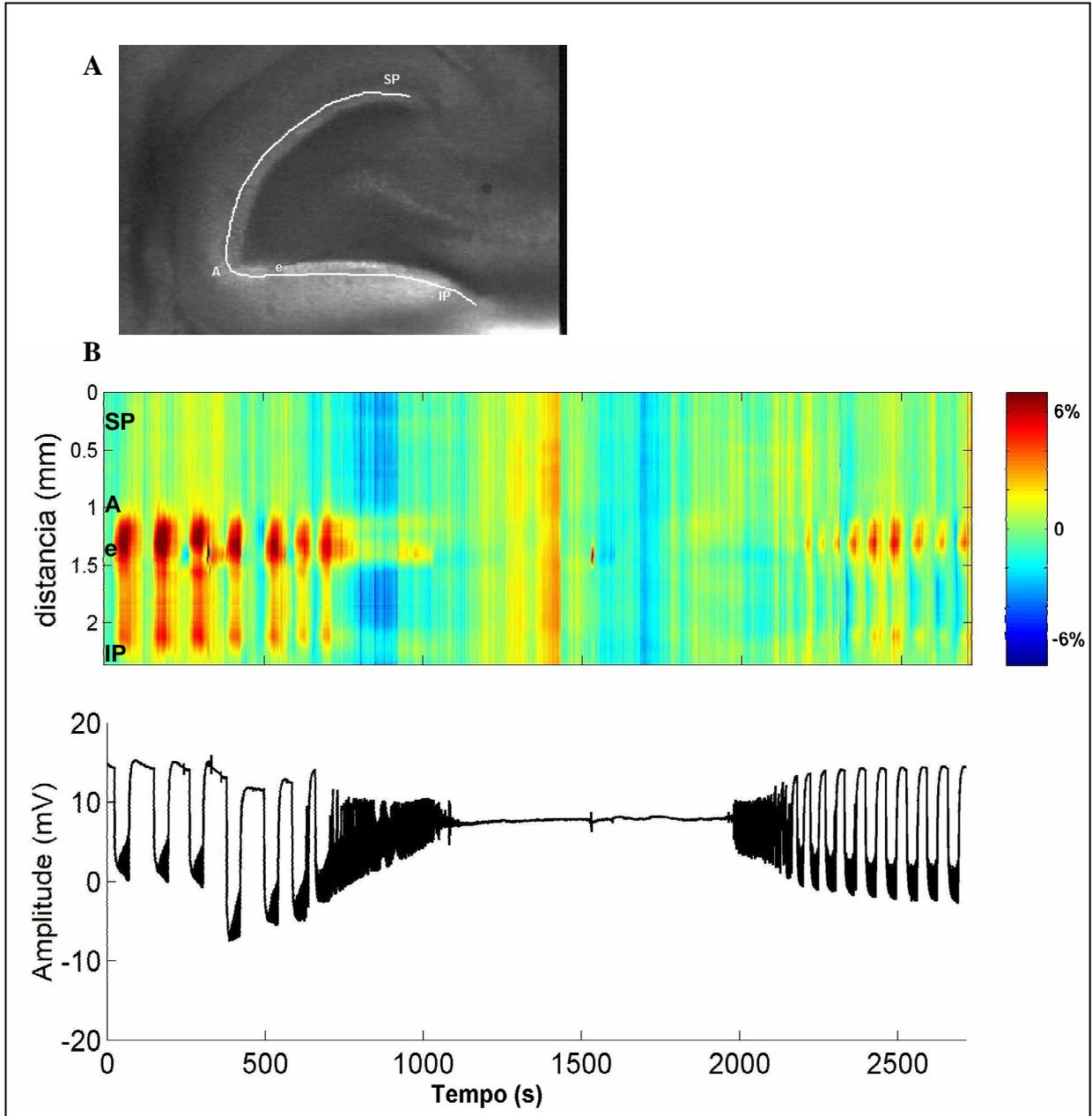
O registro do sinal óptico intrínseco (IOS) possibilitou analisar quais áreas do giro denteado encontravam-se em AE. Os resultados do IOS mostraram a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação de NaBr 5, 7, 9 e 11mM adicionado ao ACSF livre de  $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$ . Em termos temporais, da mesma forma que nos registros do potencial elétrico extracelular, observaram-se reduções da duração e do intervalo entre eventos até o completo desaparecimento destes eventos durante a aplicação do NaBr (7, 9 e 11mM). Após o retorno com ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$  as atividades reapareceram. Com a concentração de 5 mM, não ocorreu o desaparecimento destas atividades da mesma maneira que para os registros extracelulares

Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação de NaBr 5, 7, 9 e 11mM adicionado no ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$ . A perfusão do NaBr foi de 20 min. A captura das imagens foi simultânea ao PE.

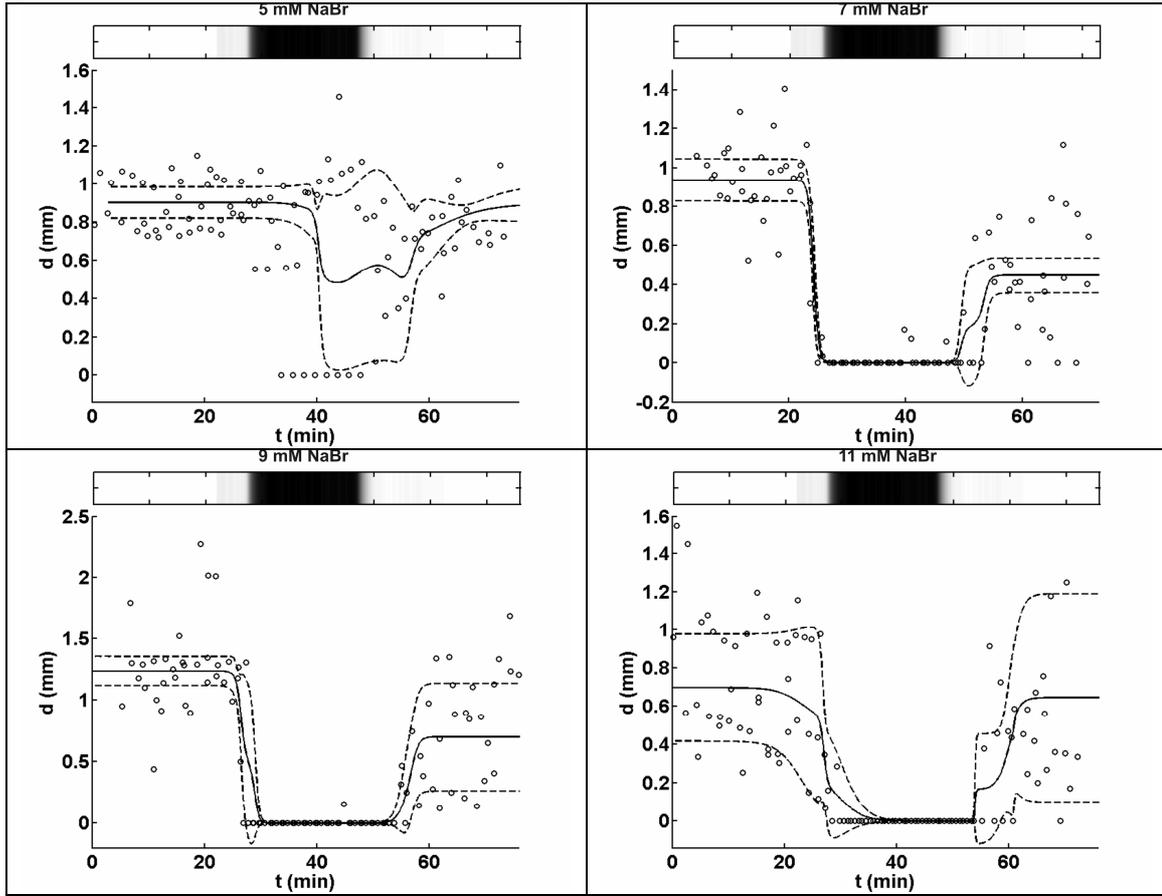
Adicionalmente ao estudo do potencial elétrico extracelular, foi feita a análise qualitativa do IOS ao longo da camada granular do GD, utilizando a imagem da variação espaço-temporal (imagem VET), com a finalidade de visualizar se o recrutamento neuronal era alterado, ou não, durante a aplicação de brometo e SITS. Pode-se observar pela imagem VET que, antes da aplicação do brometo, a atividade epileptiforme se concentrava na região entre o ápice e a parte medial da lâmina infra-piramidal (local do eletrodo). Durante a exposição ao fármaco, há uma redução no recrutamento espacial neuronal, pois a região de variação do IOS diminuiu. E após a retirada do NaBr, as atividades retornam (figura 31).

Os resultados mostraram que para a concentração de 5mM NaBr teve-se uma diminuição da área envolvida, decréscimo da distância em mm dos eventos; para 7mM, 9mM e 11mM de NaBr (figura 32), houve uma inibição da AE envolvendo as regiões do giro denteado, o ápice e a lâmina infra-piramidal, após a perfusão do NaBr e também para o bloqueador SITS (figura 33).

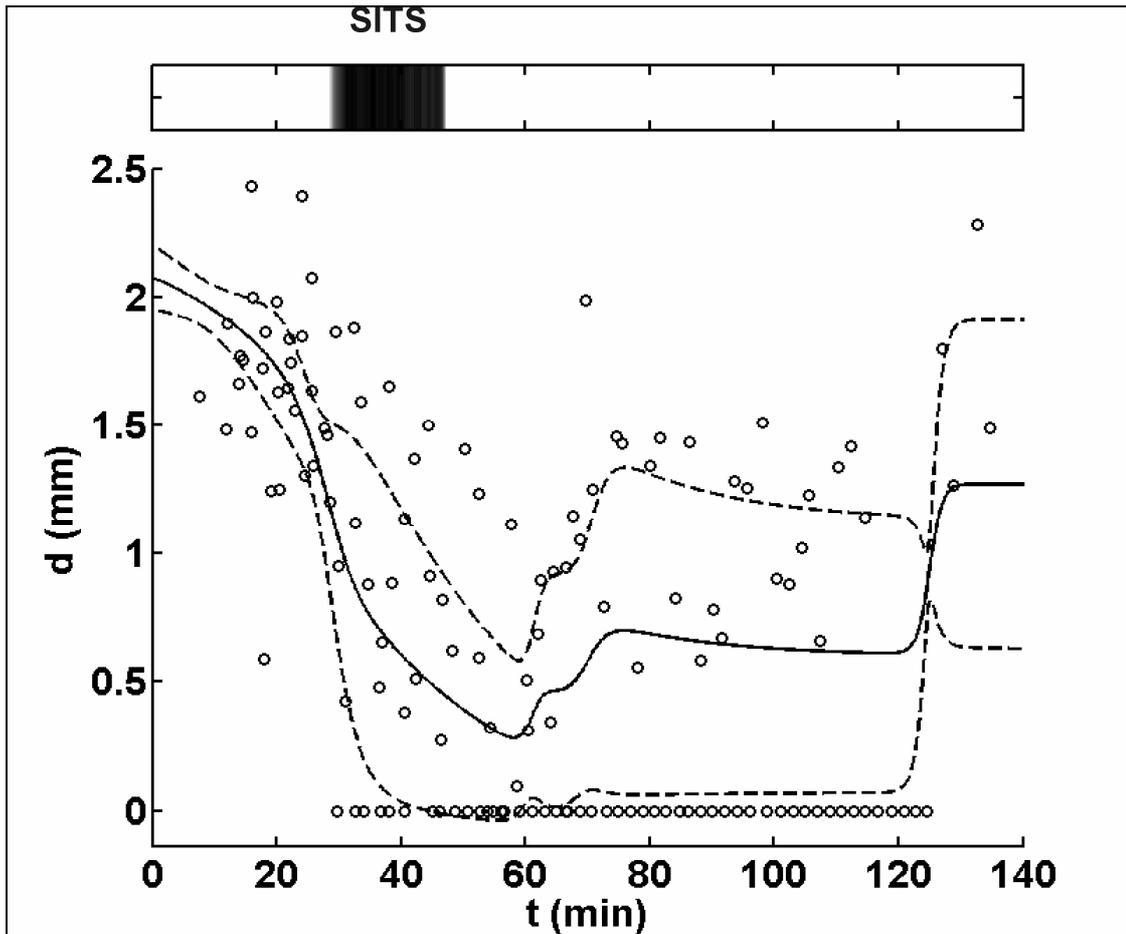
Os resultados do IOS do SITS foram semelhantes aos do NaBr, observaram-se o desaparecimento dos DS após a perfusão com SITS



**Figura 31** – **A** - Localização do eletrodo(e) na camada granular no ápice (A) do giro denteado. Para localizar a região do GD em AE foi traçada uma poligonal no GD; **B** - Exemplo de uma imagem da variação espaço temporal das AE durante a aplicação de NaBr 9mM. Simultaneamente foi registrado o potencial elétrico extracelular. Durante a exposição ao fármaco, há inibição da AE envolvendo as regiões do giro denteado, o ápice e a lâmina infra-piramidal, após a perfusão do NaBr, pois a região de variação do IOS diminuiu.



**Figura 32** – Gráficos do brometo de sódio representando os eventos (*bursts*) analisados das imagens do sinal óptico intrínseco antes, durante e após a perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup>. Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação de NaBr 5, 7, 9 e 11mM adicionado no ACSF 0-Ca<sup>++</sup>. A perfusão do NaBr foi de 20 min. As imagens dos eventos foram capturadas aproximadamente de 2 em 2 min antes, durante e após a aplicação desse fármaco. A captura das imagens foi simultânea ao PE.



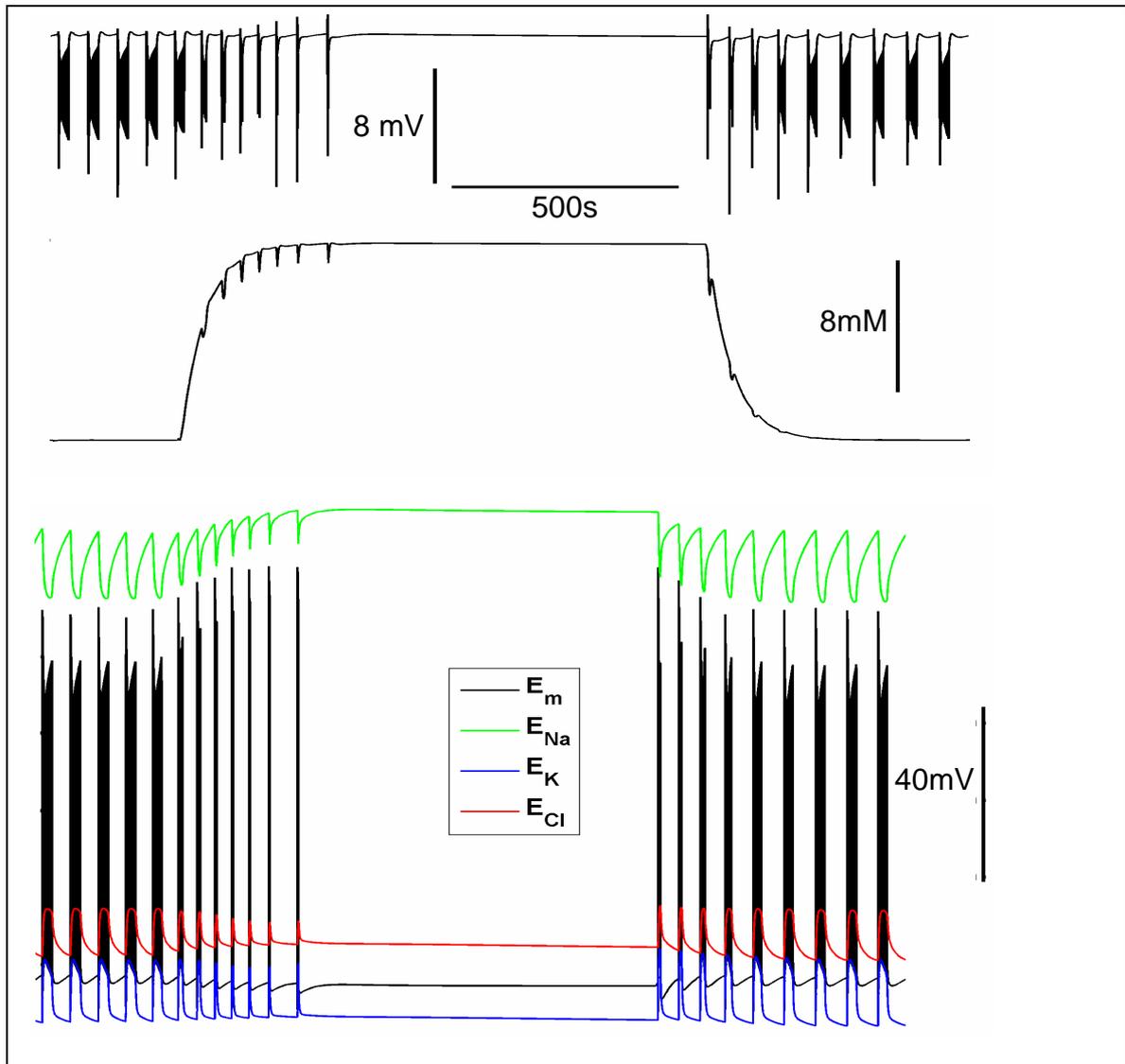
**Figura 33** – Gráfico do bloqueador SITS representando os eventos (*bursts*) analisados das imagens do sinal óptico intrínseco antes, durante e após a perfusão com SITS. Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE durante experimentos com aplicação do bloqueador SITS 1mM adicionado na ACSF 0-Ca<sup>++</sup> + alto K<sup>+</sup>. A perfusão do SITS foi de 20- 25 min. A captura das imagens foi simultânea ao registro do PE. As imagens dos eventos foram capturadas aproximadamente de 2 em 2 min antes, durante e após a aplicação deste bloqueador de canais de cloreto voltagem-dependentes.

### 5.3 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

#### SIMULAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO NaBr SOBRE A PERMEABILIDADE DO CLORETO

O Br<sup>-</sup> passa através dos canais de Cl<sup>-</sup> e, assim, uma hipótese para seu efeito é que pode provocar a redução da permeabilidade do Cl<sup>-</sup>. O íon Br<sup>-</sup> foi incluído no modelo de atividades epileptiformes não-sinápticas. Para incorporá-lo no modelo, foi considerado que esse íon pode se movimentar através do meio extracelular, por eletrodifusão, e através da membrana celular, através dos canais de Cl<sup>-</sup> e co-transportes cátion-cloreto.<sup>26</sup> Em relação aos canais, a permeabilidade de Br<sup>-</sup> foi considerada 1,4 vezes a permeabilidade do Cl<sup>-</sup>. Para os co-transportes KCC e NKCC, a afinidade do Br<sup>-</sup> foi considerada menor do que a do Cl<sup>-</sup>. Após

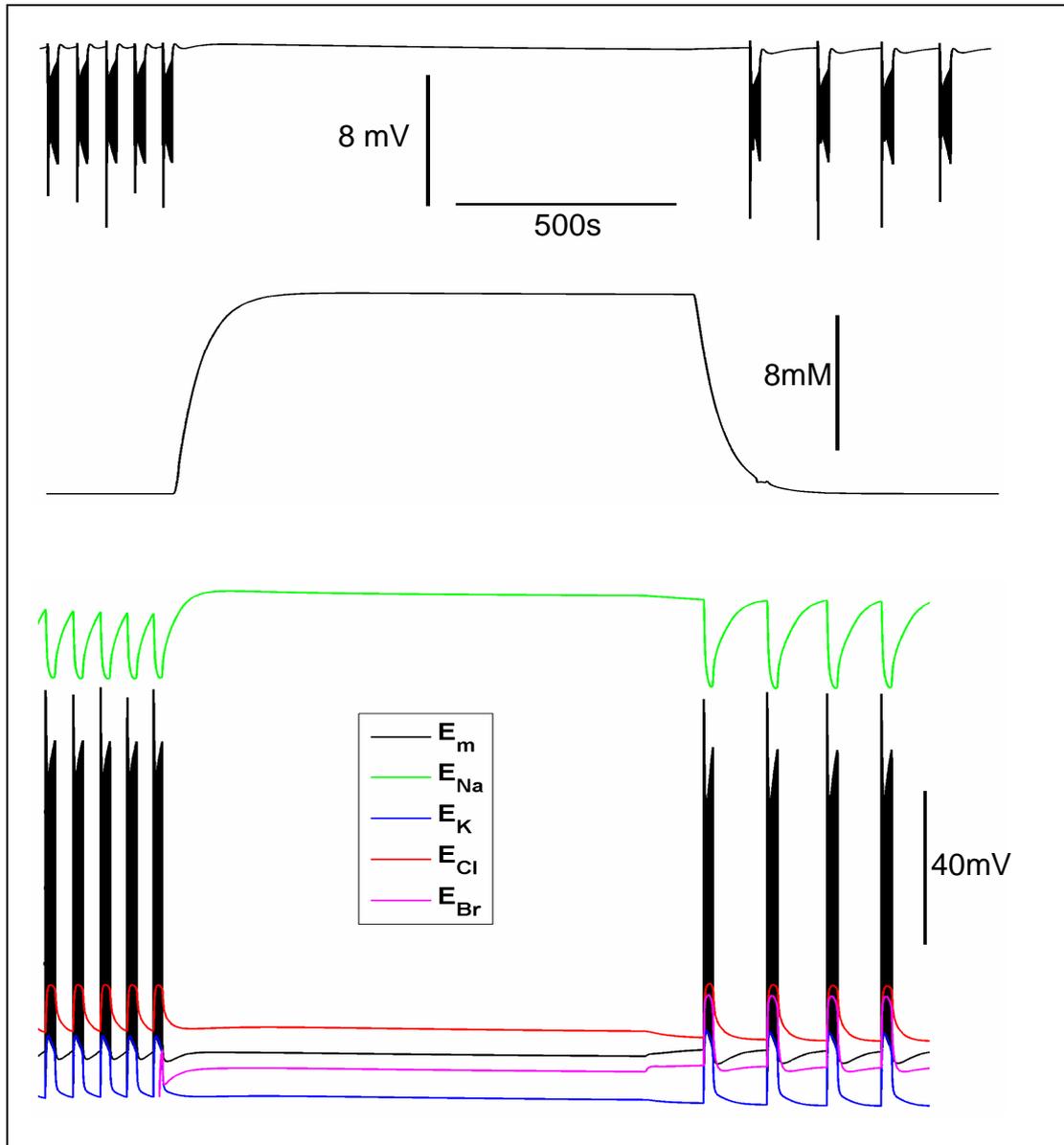
induzir as atividades epileptiformes aumentando a  $[K^+]_o$  para 8 mM, a  $[Br^-]$  nos compartimentos de borda que representam a solução de perfusão foi alterada de zero para 11 mM. A figura abaixo mostra o bloqueio das atividades epileptiformes provocado pelo  $Br^-$ . Pode-se observar que o aumento da  $[Br^-]_o$  causa, inicialmente, a redução da duração do evento e do intervalo entre eventos, como indica o potencial extracelular (figura 34). Posteriormente, com o aumento da  $[Br^-]_o$  até 11 mM, ocorre o bloqueio das atividades. A redução da  $[Br^-]_o$  até zero faz com que o sistema retorne para o estado de atividades característico do período anterior à aplicação desse íon. Analisando os potenciais de Nernst e transmembrânico durante a manobra, pode-se observar que o aumento da  $[Br^-]_o$  faz com que o potencial transmembrânico fique mais negativo, afastando-se do potencial de Nernst de  $Cl^-$ . Conseqüentemente ocorre uma redução da excitabilidade e os eventos cessam. Segundo as simulações computacionais com esse modelo, as atividades epileptiformes não-sinápticas são induzidas da seguinte forma: a princípio, o potencial de Nernst de  $Cl^-$  é mais negativo do que o de membrana caracterizando o efeito inibitório desse ânion. Com o aumento do  $K^+$  extracelular para 8 mM, ocorre o acúmulo de  $Cl^-$  intracelular. Conseqüentemente, o potencial de Nernst do  $Cl^-$  fica mais positivo que o de membrana. Portanto, como a permeabilidade desse íon é relativamente alta, o seu acúmulo no meio extracelular causa a despolarização neuronal que sustenta as atividades epileptiformes.



**Figura 34** – Simulação com NaBr mostrando redução da permeabilidade ao  $\text{Cl}^-$ . Com o aumento da concentração de  $\text{K}^+$  extracelular para 8 mM, ocorre o acúmulo de  $\text{Cl}^-$  intracelular. Conseqüentemente, o potencial de *Nernst* do  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}}$ ) fica mais positivo que o de membrana ( $E_m$ ). Portanto, como a permeabilidade do  $\text{Cl}^-$  é relativamente alta, o seu acúmulo no meio extracelular causa a despolarização neuronal que sustenta as atividades epileptiformes. Analisando os potenciais de *Nernst* e transmembrânico durante a manobra, pode-se observar que o aumento da  $[\text{Br}]_o$  faz com que o  $E_m$  fique negativo, afastando do  $E_{\text{Cl}}$ . Conseqüentemente ocorre uma redução da excitabilidade e os eventos cessam.

### SIMULAÇÃO CONSIDERANDO O EFEITO INIBITÓRIO DO $\text{Br}^-$

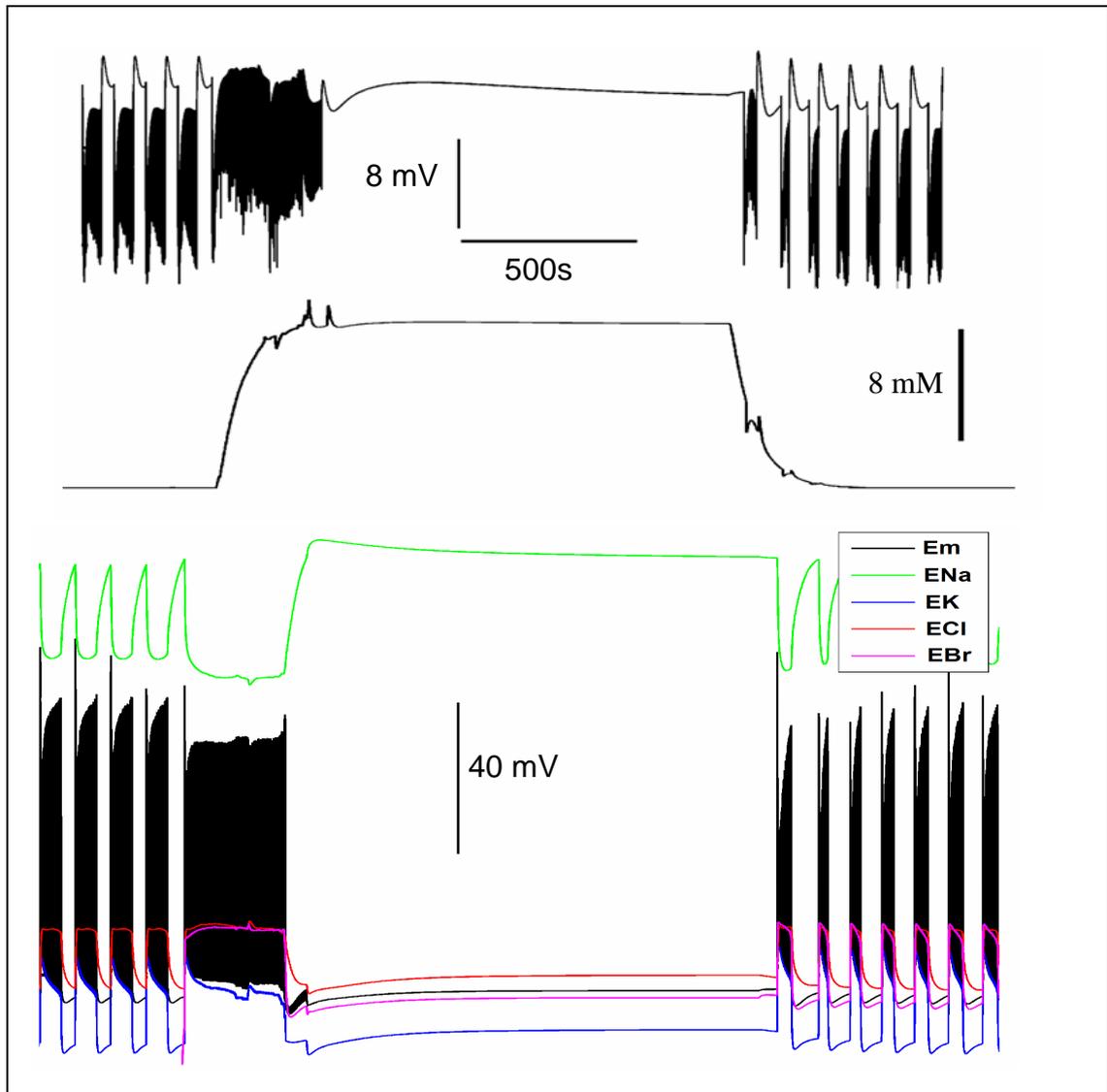
Na próxima simulação, ao incorporar o  $\text{Br}^-$  no modelo, foi considerado que ele pode passar através dos canais de  $\text{Cl}^-$ , porém, com uma permeabilidade maior (1,4 vezes). Nessa simulação, não foi considerada a redução da permeabilidade do  $\text{Cl}^-$  promovida pelo  $\text{Br}^-$ .<sup>26</sup>



**Figura 35** – 2º Simulação com NaBr demonstra o efeito inibitório. O  $E_{Br}$  está mais negativo que o  $E_m$ , o que faz o potencial de membrana tender a este valor mais negativo causando uma hiperpolarização neuronal.

### SIMULAÇÃO: EFEITO INIBITÓRIO DO $Br^-$ E REDUÇÃO DA PERMEABILIDADE DO $Cl^-$

Considerando agora que o  $Br^-$  passe pelos canais de  $Cl^-$  com uma permeabilidade elevada e que, além disso, reduz a permeabilidade do  $Cl^-$  foi possível observar um aumento transiente de excitabilidade no início da aplicação do  $Br^-$  (figura 36). Nessa simulação, como a permeabilidade do  $Br^-$  é ainda maior do que a considerada anteriormente (10 vezes a do  $Cl^-$ ), o  $Br^-$  acumula rapidamente no meio intracelular e seu  $E_{Br}$  torna-se mais positivo que o  $E_m$ .



**Figura 36** – Simulação com NaBr demonstra o efeito inibitório do NaBr juntamente com a redução da permeabilidade do  $Cl^-$ . Com o aumento da permeabilidade do  $Br^-$  (10x), este íon se acumula no meio intracelular e  $E_{Br}$  fica mais positivo que o  $E_m$  causando inicialmente uma despolarização. O aumento de sua concentração reduz a permeabilidade do  $Cl^-$ , levando à hiperpolarização das células.

## 6 DISCUSSÃO

Brometo é o fármaco mais clássico no tratamento das epilepsias e foi o principal até a introdução do fenobarbital em 1912. Este se diferencia dos outros fármacos antiepilépticos por ser um simples sal inorgânico, além de exibir ações sedativas. Também possui grande potência anticonvulsivante em casos de crises tônico-clônicas generalizadas e outros tipos de crises.<sup>8, 9, 58</sup>

Este trabalho teve como objetivo primeiramente estudar a eficácia do brometo de sódio num modelo de atividade epileptiforme não-sináptica (modelo do ACSF 0-Ca<sup>++</sup>+alto K<sup>+</sup>), na região do giro denteado, avaliando, portanto sua ação diretamente na membrana neuronal.<sup>46, 50, 59</sup> A atividade epileptiforme (AE) típica da supressão de conexões sinápticas caracterizam-se por uma salva de espículas, formadas pelo disparo simultâneo de potenciais de ação, denominadas de populações de espículas (PS's do inglês *population spike*), superpostas a um deslocamento negativo da linha de base (DC). Esses eventos são chamados de descargas em salva (DS), caracterizadas por salvas de potenciais de ação (*burst*).<sup>43, 49</sup> As DS na região do giro denteado apresentam atividades neuronais síncronas com maiores durações e amplitudes, sob condições experimentais de alta concentração extracelular de K<sup>+</sup> e baixa concentração de Ca<sup>++</sup>.<sup>47, 50, 51</sup>

Em nosso estudo, obtivemos o bloqueio da atividade epileptiforme pelo NaBr em concentrações superiores à 5mM. Os gráficos da relação concentração-resposta (concentração do fármaco x tempo de supressão da atividade epileptiforme), mostraram que na concentração de 5mM teve-se uma redução da amplitude das populações de espículas; com 7mM houve o bloqueio da atividade epileptiforme em 70% dos registros; 9mM é a concentração suficiente para a completa supressão da AE e com 11mM observamos que houve saturação da resposta. Portanto, o efeito do brometo de sódio é concentração dependente. Meierkord observou um limiar de resposta com valores mais elevados. Meierkord e colaboradores avaliaram a frequência dos PS's somente em descargas na fase ictal.<sup>23</sup> Estes autores utilizaram as mesmas concentrações de NaBr e obtiveram para a concentração de 5mM uma redução de 25% na frequência dos eventos epileptiformes. Em 7mM houve uma redução de 50% e bloqueio em uma fatia, já em 9 mM aconteceu uma redução de 80% e NaBr 11mM bloqueou completamente as atividades epileptiformes em todas as fatias.<sup>23</sup> Assim, este autor verificou que o bloqueio completo das descargas epileptiformes com NaBr se dá na concentração de 11mM. As diferenças deste trabalho, com o nosso estudo incluem: 1. estes autores não

zeraram o cálcio do ACSF, mas utilizaram menor concentração deste íon para indução da atividade epileptiforme; 2. o estudo foi realizado na área de CA1 do hipocampo e não no giro denteado. Talvez estes fatores possam explicar as diferenças de resultados entre o presente trabalho e o de Meierkord e colaboradores. No nosso estudo, observamos redução da duração dos eventos, do intervalo entre eventos, das populações de espículas e redução da amplitude da componente DC após a perfusão com ACSF 0-Ca<sup>++</sup> e alto K<sup>+</sup>.

A semelhança dos registros do potencial elétrico extracelular após a infusão do NaBr com aqueles obtidos com a perfusão com SITS, sugere que o efeito do brometo seja semelhante ao do íon cloreto, podendo o brometo utilizar os canais de cloro voltagem-dependentes.<sup>26</sup> A família dos canais de cloro voltagem-dependentes é expressa em níveis significativos no cérebro e inclui os subtipos CIC-2, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 e CIC-7. Bloqueadores de canais de cloreto voltagem-dependentes como DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico) e SITS (ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfônico), modulam canais aniônicos e transportadores de atividade e em ambos o mecanismo é reversível.<sup>33</sup> DIDS e NPPB suprimiram a atividade epileptiforme não-sináptica no estudo de Bikson e colaboradores (1999). Somente o CIC-2 tem se expressado em neurônios e é ativado em potenciais de membrana de repouso. A ação do bloqueador SITS é inespecífica quanto ao tipo de canal de cloro atuando no canal de cloro ativado por cálcio (ClCa), no canal de cloro do tipo proteína transmembrana (CLIC) e no subtipo de canal de cloro voltagem-dependente CIC-2. Esse subtipo de canal de cloreto voltagem-dependente, pode ser ativado por hiperpolarização e acidificação extracelular, e é altamente expressado no cérebro. A seqüência de seletividade do CIC-2 aos haletos é Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > I<sup>-</sup>. Isto se aplica tanto à condutância quanto à seqüência de permeabilidade. A ativação de CIC-2 pela concentração de cloreto intracelular pode ser identificada em neurônios hipocampais, prevenindo a acumulação de cloreto no meio intracelular, como pode ocorrer em particular durante um aumento de freqüência na atividade neuronal.<sup>29</sup>

A maioria dos trabalhos estudou o efeito do brometo em modelos sinápticos.<sup>23-25</sup> Meierkord utilizou NBQX (bloqueador de receptor glutamatérgico, AMPA) e APV (bloqueador de receptor NMDA) em culturas de neurônios para isolar potenciais pós-sinápticos inibitórios mediados por GABA. Suzuki e colaboradores (1994) utilizaram GABA e sugerem que o brometo potencializa correntes ativadas por GABA em uma concentração terapêutica de 10 mM a 20 mM, causando uma grande hiperpolarização induzida por este. No estudo de Meierkord e colaboradores (2000) através de um protocolo de estimulação pulso-pareado, usado para monitorar a eficácia da inibição GABAérgica em concentrações de 5 mM

de NaBr, foi verificado um aumento significativo na amplitude inibitória pós-sináptica em culturas de neurônios hipocâmpais.<sup>23</sup> Em células ganglionares (8º gânglio abdominal simpático de rã) o brometo de sódio causou hiperpolarização quando foi feita uma substituição equimolar de cloreto de sódio (112mM) por NaBr em ACSF. Neste estudo, também se observaram efeitos excitatórios sinápticos mínimos. A hiperpolarização poderia ter ocorrido em consequência da maior permeabilidade da membrana pelo brometo do que ao cloreto.<sup>24</sup> Nosso trabalho destaca-se por abolir as descargas epileptogênicas num modelo de indução de atividade epileptiforme com ausência da atividade sináptica.

Os primeiros estudos do sinal óptico intrínseco foram feitos por Orskov e Parpart (1935), em células em suspensão colocando-as em solução hipertônica. Eles observaram que havia redução da quantidade de luz transmitida. Adicionalmente, colocando as células em solução hipotônica, verificaram o aumento da luz transmitida. Sabendo que o aumento da osmolaridade extracelular causava redução do volume celular, associaram a diminuição de transmitância a essa redução do volume celular. De forma análoga, associaram o aumento da transmitância ao inchaço celular por causa da solução hipotônica. Posteriormente, surgiram explicações mais detalhadas relacionadas a esse IOS: a redução de volume, por aumentar a concentração de substâncias e organelas intracelulares, aumenta o espalhamento reduzindo a transmitância. Por outro lado, o inchaço celular, por reduzir as concentrações intracelulares, favorece a transmitância. Adicionalmente, as variações do volume celular causam variações dos índices de refração intracelular, extracelular e da camada bilipídica, alterando, conseqüentemente, os desvios sofridos pelos raios luminosos.<sup>60, 61</sup> No estudo de AITKEN e colaboradores (1999), em fatias de hipocampo, esses autores mostraram que a excitação sináptica leva a uma redução da reflectância ou a um aumento na transmitância de luz pelo tecido. Segundo esses autores, esse é um exemplo de um sinal relativamente rápido representando a ativação focal e, presumivelmente, resultante do inchaço celular devido aos fluxos iônicos. Num estudo de Weissinger e colaboradores (2000) foram feitos simultaneamente registros extracelulares e de imagens do sinal óptico intrínseco com objetivo de se estudar mudanças espaço-temporal e aparecimento de atividade epileptiforme e propagação de depressão alastrante durante o desenvolvimento do córtex entorrinal.<sup>56</sup> Esta técnica é especialmente importante por permitir ver a relação espaço-temporal da atividade epileptiforme na fatia de hipocampo. Houve uma inibição da AE envolvendo as regiões do giro denteado, o ápice e a lâmina infra-piramidal, após a perfusão com NaBr. A reprodução do comportamento espaço-temporal durante o bloqueio foi possível supondo-se o efeito

competitivo entre o  $\text{Br}^-$  e o  $\text{Cl}^-$  tanto em canais como em co-transportes. Não encontramos registro similar em outros estudos com NaBr.

O estudo da atividade epileptiforme não-sináptica, no giro denteado do hipocampo de rato, é um instrumento importante para a investigação da influência dos mecanismos subcelulares não-sinápticos durante a atividade epileptiforme.<sup>44, 50</sup> O desenvolvimento de um modelo computacional é uma ferramenta que auxilia na descrição das propriedades eletroquímicas desses mecanismos, para simular atividades epileptiformes sustentadas apenas por modulações não-sinápticas.<sup>52</sup> Rodrigues e colaboradores (2003) desenvolveram um modelo matemático capaz de simular computacionalmente a AE sustentada por conexões não-sinápticas. Esse modelo considera o meio extracelular formado por uma rede tridimensional de compartimentos. Fazem parte do modelo dois corpos celulares, um glial e outro neuronal, representando a camada de corpos celulares do GD e também arborizações dendríticas desconectadas dos compartimentos extracelulares. As simulações computacionais dão um embasamento teórico e possibilitam estudar a natureza biofísica e o comportamento neuronal no hipocampo. As simulações realizadas neste estudo auxiliaram no entendimento do mecanismo de ação do NaBr. Na simulação do efeito do  $\text{Br}^-$  sobre a permeabilidade do  $\text{Cl}^-$  sugere-se, para explicar o efeito inibitório do  $\text{Br}^-$  sobre a atividade epileptiforme, que esse íon, ao reduzir a permeabilidade do  $\text{Cl}^-$ , diminui o efeito excitatório do  $\text{Cl}^-$ , conseqüentemente ocorre a hiperpolarização celular reduzindo a excitabilidade. Na simulação, considerando a redução da permeabilidade do  $\text{Cl}^-$ , o  $\text{Br}^-$  no modelo matemático, foi considerado como podendo passar através dos canais de  $\text{Cl}^-$  com uma permeabilidade maior (1,4 vezes), causando uma hiperpolarização das membranas celulares. O brometo possui potencial de Nernst mais negativo que o potencial de membrana ( $E_m$ ) e acaba arrastando o  $E_m$  para próximo dele. Na simulação do efeito inibitório do  $\text{Br}^-$  juntamente com a redução da concentração do cloreto, o brometo passa pelos canais de cloro com uma permeabilidade elevada e além disso, reduz a permeabilidade do cloreto; o brometo acumula-se rapidamente no meio intracelular e seu potencial de Nernst torna-se mais positivo que o de membrana. Portanto, no início da aplicação do  $\text{Br}^-$ , esse íon passa a ser excitatório, mas o aumento de sua concentração reduz a permeabilidade do  $\text{Cl}^-$ , levando à hiperpolarização das células, com conseqüente inibição da atividade epileptiforme.

O presente trabalho evidencia que o NaBr bloqueia a atividade epileptiforme induzida por ACSF 0- $\text{Ca}^{++}$  e alto  $\text{K}^+$  independentemente de mecanismos sinápticos. Estes dados poderão explicar a resposta terapêutica aos brometos em determinadas síndromes epilêpticas.<sup>7, 9</sup>

## 7 CONCLUSÕES

1. A concentração de 9 mM de NaBr é a concentração mínima necessária para o completo bloqueio das atividade epileptiforme com tempo mínimo de extinção;
2. Simulações computacionais sugerem duas explicações para o efeito inibitório do NaBr sobre as AE: (a) atuação competitiva do  $\text{Br}^-$  com o  $\text{Cl}^-$ , reduzindo a permeabilidade deste íon que, por sua vez, reduz seus efluxo e influxo durante os períodos interictal e ictal, respectivamente; (b) o potencial de Nernst do  $\text{Br}^-$  por ser mais negativo que o  $E_m$ , hiperpolariza a membrana neuronal reduzindo a excitabilidade.
3. O mecanismo de ação do  $\text{Br}^-$  provavelmente envolve canais de cloreto voltagem-dependentes do subtipo  $\text{ClC-2}$ .
4. O registro do sinal óptico intrínseco permitiu visualizar a inibição da atividade epileptiforme envolvendo as regiões do giro denteado, o ápice e a lâmina infra-piramidal, após a perfusão com NaBr.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na supressão das atividades epileptiformes pelo NaBr, pretendemos realizar estudos utilizando a técnica de *patch-clamp*, para avaliar os canais de cloreto envolvidos no mecanismo de ação do Br<sup>-</sup>. Além disso, temos interesse de ampliar estes estudos: 1º avaliando o efeito do brometo em fatias de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento com pilocarpina e em tecido hipocampal obtido de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso; 2º verificando o possível envolvimento do Br<sup>-</sup> em receptores GABAérgicos e glutamatérgicos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gastaut H. Letter: 'Epileptic seizures'. *Dev Med Child Neurol* 1973;15(5):688-9.
2. Fernandes JG, Sander JWAS. *Fundamentos Neurobiológicos das epilepsias: Aspectos clínicos e cirúrgicos*. Porto Alegre: Editora Lemos; 1992.
3. Hauser WA. Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology* 1990;40(5 Suppl 2):9-13.
4. Elwes RD, Johnson AL, Shorvon SD, Reynolds EH. The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. *N Engl J Med* 1984;311(15):944-7.
5. Mattson RH, Cramer JA, Collins JF, Smith DB, Delgado-Escueta AV, Browne TR, et al. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *N Engl J Med* 1985;313(3):145-51.
6. Yacubian EMT. Tratamento medicamentoso das epilepsias. In. 2 ed. São Paulo: Editora Lemos; 2004. p. 318.
7. Joynt RJ. The use of bromides for epilepsy. *Am J Dis Child* 1974;128(3):362-3.
8. Boenigk HE, Lorenz JH, Jurgens U. [Bromides--today still useful as antiepileptic substances?]. *Nervenarzt* 1985;56(10):579-82.
9. Ernst JP, Doose H, Baier WK. Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. *Brain Dev* 1988;10(6):385-8.
10. Oguni H, Hayashi K, Oguni M, Mukahira A, Uehara T, Fukuyama Y, et al. Treatment of severe myoclonic epilepsy in infants with bromide and its borderline variant. *Epilepsia* 1994;35(6):1140-5.
11. Steinhoff BJ, Kruse R. Bromide treatment of pharmaco-resistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: a clinical study. *Brain Dev* 1992;14(3):144-9.
12. McNamara JO. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *The journal of Neuroscience* 1994;14(6):3413-3425.
13. Guerreiro AM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Considerações Gerais. In: *Epilepsia*. São Paulo: Editora Lemos; 2000. p. 419.
14. Al-Noori S, Pierson MG, Swan JW. Bases celulares das epilepsias. In: Da Costa JC, Palmira A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA, editors. *Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo: Editora Lemos; 1998. p. 33-137.
15. Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2003;2(1):33-42.

16. Frances JE. Pediatric epilepsy models. *Epilepsy Res* 2006;68:19-94.
17. Levy HR, Mattson HR, Meldrum SB. Other antiepileptic drugs. In: Fritz ED, editor. *Antiepileptic Drugs*. New York: Raven Press; 1995. p. 949-951.
18. Ryan M, Baumann RJ. Use and monitoring of bromides in epilepsy treatment. *Pediatr Neurol* 1999;21(2):523-8.
19. Takayanagi M, Yamamoto K, Nakagawa H, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, et al. Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy. *Brain Dev* 2002;24(3):194-6.
20. Kagitani-Shimono K, Imai K, Otani K, Kamio N, Okinaga T, Toribe Y, et al. Epilepsy in Wolf-Hirschhorn syndrome (4p-). *Epilepsia* 2005;46(1):150-5.
21. Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting JS, Ernst JP. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol* 2007;22(4):414-8.
22. Woodbury DM, Pippenger CE. Bromides. In: Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, editors. *Antiepileptic drugs*. 2 ed. New York: Editora Raven; 1982. p. 797-801.
23. Meierkord H, Grunig F, Gutschmidt U, Gutierrez R, Pfeiffer M, Draguhn A, et al. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361(1):25-32.
24. Montoya GA, Riker WK. A study of the actions of bromide on frog sympathetic ganglion. *Neuropharmacology* 1982;21(6):581-5.
25. Suzuki S, Kawakami K, Nakamura F, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1994;19(2):89-97.
26. Franciolini F, Nonner W. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 1987;90(4):453-78.
27. Clayton GH, Staley KJ, Wilcox CL, Owens GC, Smith RL. Developmental expression of ClC-2 in the rat nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;108(1-2):307-18.
28. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002;82(2):503-68.
29. Staley K. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J Neurophysiol* 1994;72(1):273-84.
30. Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 2003;26(4):199-206.

31. Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> regulation. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 1):C1516-25.
32. Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J. Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci* 1999;19(8):2843-51.
33. Cabantchik ZI, Greger R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 1992;262(4 Pt 1):C803-27.
34. Vaca L. SITS blockade induces multiple subconductance states in a large conductance chloride channel. *J Membr Biol* 1999;169(1):65-73.
35. Koszela-Piotrowska I, Choma K, Bednarczyk P, Dolowy K, Szewczyk A, Kunz WS, et al. Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell Mol Biol Lett* 2007;12(4):493-508.
36. Pirttilä T. Expression and functions of cystatin C in epileptogenesis and epilepsy. Finland: Kuopio; 2006.
37. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31(3):571-591.
38. Silva FHL. Anatomic Organization and Physiology of the Limbic Cortex. *Physiological Review* 1990;70(2):453-511.
39. Deller T. The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL). *Anat Embryol (Berl)* 1998;197(2):89-103.
40. Scharfman HE, Sollas AL, Smith KL, Jackson MB, Goodman JH. Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2002;454(4):424-39.
41. Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P. Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* 1991;1(4):415-435.
42. Kandel Erik R., Schwartz James H., M. JT. Principles of Neural Science. 4 ed. United States of America: Mc Graw- Hill; 2000.
43. Jefferys JG, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 1982;300(5891):448-50.
44. Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science* 1982;218(4574):810-2.
45. Jefferys JG. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol Rev* 1995;75(4):689-723.

46. Taylor CP, Dudek FE. Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. *J Neurophysiol* 1984;52(1):143-55.
47. Xiong ZQ, Stringer JL. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. *J Neurophysiol* 2000;83(3):1443-51.
48. Traub RD, Wong RK, Miles R, Knowles WD. Neuronal interactions during epileptic events in vitro. *Fed Proc* 1985;44(15):2953-5.
49. Dudek FE, Kim YI, Bouskila Y. Electrophysiology of the suprachiasmatic nucleus: synaptic transmission, membrane properties, and neuronal synchronization. *J Biol Rhythms* 1993;8 Suppl:S33-7.
50. Pan E, Stringer JL. Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties. *J Neurophysiol* 1996;75(1):124-32.
51. Carvalho RS. Transições Espontâneas de Bursts Epileptiformes para Depressão Alastrante. São João Del Rei: Universidade Federal de São João Del Rei; 2003.
52. Rodrigues AM. Modelo Eletroquímico de Atividades Epileptiformes Sustentadas por Modulações Não-Sinápticas. São João Del Rei: Universidade Federal de São João Del Rei; 2003.
53. Almeida A-CGd, Teixeira HZ, Duarte MA. Modeling extracellular space electrodiffusion during Leão's spreading depression. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51(3):450-458.
54. Nunez PL. *Electrical fields of the Brain*. New York: Oxford University Press; 1988.
55. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates; 1992.
56. Weissinger F, Buchheim K, Siegmund H, Heinemann U, Meierkord H. Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiol Dis* 2000;7(4):286-98.
57. Nicholson C, Hounsgaard J. Diffusion in the slice microenvironment and implications for physiological studies. *Fed Proc* 1983;42(12):2865-8.
58. Woody RC. Bromide therapy for pediatric seizure disorder intractable to other antiepileptic drugs. *J Child Neurol* 1990;5(1):65-7.
59. Dudek FE, Yasumura T, Rash JE. 'Non-synaptic' mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol Int* 1998;22(11-12):793-805.
60. Aitken PG, Tombaugh GC, Turner DA, Somjen GG. Similar propagation of SD and hypoxic SD-like depolarization in rat hippocampus recorded optically and electrically. *J Neurophysiol* 1998;80(3):1514-21.

61. Aitken PG, Fayuk, D., Somjen, G. G., Turner, D. A. Use of Intrinsic Optical Signals to Monitor Physiological Changes in Brain Tissue Slices; 1990.

## **ANEXOS**

**Anexo A. E-mail de aceitação do editor da revista Epilepsy Research**

Ms. Ref. No.: EPIRES-D-08-00119

Title: EFFECT OF SODIUM BROMIDE ON NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY

Epilepsy Research

Dear Dr. Carlesso,

Your submission entitled "EFFECT OF SODIUM BROMIDE ON NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY" has been assigned the following manuscript number: EPIRES-D-08-00119.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/epires/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Siobhain O'Brien  
Journal Manager  
Epilepsy Research

**ANEXO B – Artigo submetido à Revista Epilepsy Research**

**EFFECT OF SODIUM BROMIDE ON NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY**

Fernanda N Carlesso<sup>1</sup>; Antônio M Rodrigues<sup>2</sup>; Máisa A Da Costa<sup>2</sup>; Lucélia S Pereira<sup>2</sup>.

Antônio-Carlos G de Almeida<sup>2</sup>; Jaderson C Da Costa<sup>1</sup>

1- Neuroscience Laboratory, Biomedical Research Institute; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil;

2- Experimental and Computational Neuroscience Laboratory, Biomedical Engineering Department, Federal University of São João Del Rei, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jaderson Costa da Costa

Neuroscience Laboratory, Biomedical Research Institute; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

Av. Ipiranga, 6690.

Porto Alegre, RS, Brazil- 90610-000

Tel./Fax: +55 51 33203312

E-mail: [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)

Running title: Nonsynaptic mechanisms of Sodium Bromide

Key words: Sodium Bromide, Epilepsy, SITS, Nonsynaptic Epileptiform Activity, Dentate Gyrus, Intrinsic Optical Signal.

Number of text pages: 13

Number of tables:-

Number of figures: 4

## Summary

**Purpose:** In the present study, we investigated the NaBr effect on nonsynaptic epileptiform activity (NEA) simultaneously monitoring extracellular field potential and intrinsic optical signal images.

**Methods:** Investigations were carried on hippocampal slices submitted to nonsynaptic epileptiform activity induction by perfusion with zero-added artificial cerebrospinal fluid (zero-  $\text{Ca}^{++}$  ACSF). Effects were analyzed and quantified on the granular layer of the dentate gyrus using image processing.

**Results:** Bromide application suppressed epileptiform activity. The minimum bromide concentration necessary to full blockage was 9mM, according to dose-response curve. The recruited length measured with the IOS is very sensitive in identifying the nonsynaptic activities suppression. Similar results were obtained after application of chloride channels blocker.

**Discussion:** Our findings suggest that chloride might sustain the neuronal depolarization during nonsynaptic epileptiform activities. Additionally, effect of bromide may be suggested by the chloride blockers effect. Through competition with chloride in its channels, bromide may reduce chloride permeability, contributing for NEAs suppression.

## Introduction

Bromides were the first effective treatment for epilepsy. Introduced in 1853 by Sir Charles Locock, bromides remained useful as therapeutic option for nearly 60 years. With the advent of less toxic and more effective treatments, the use of bromides became less usual (Joynt, 1974). However, bromides are still a valuable tool in the treatment of epilepsies refractory to current antiepileptic drugs, such as medically refractory tonic-clonic seizures and severe pediatric myoclonic epilepsies (Korinthenberg *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 1988; Steinhoff *et al.*, 1992).

Despite the fact bromide therapy has been used for decades, the pharmacological activity of bromides remains without a complete elucidation. Maybe the most possible mechanism is related to an increase of neuronal hyperpolarization, mediated by inhibitory postsynaptic potentials (Woodbury and Pippenger, 1982). Br<sup>-</sup> ions cross cellular membranes more quickly than Cl<sup>-</sup>, enhancing GABA-activated currents and leading to large hyperpolarization. Thus, the antiepileptic effect of bromide is believed to be due to the potentiation of inhibitory postsynaptic potentials by GABA (Suzuki *et al.*, 1994). But not only GABA-activated chloride channels are more permeable to bromide, the voltage-dependent are also more permeable (I > Br > Cl > F; 1.98:1.46:1:0.44) (Woodbury and Pippenger, 1982; Franciolini and Nonner, 1987). This fact justifies why bromide effects are still present on non-synaptic epileptiform activity (NEA). Meierkord *et al.* (2000) observed consistent blockage of NEAs, when hippocampal slices bathed with low-Ca<sup>++</sup> solution were perfused with NaBr at the concentration of 11 mM.

The intrinsic optical signal (IOS) is a powerful tool for monitoring propagation and recruitment of neuronal activity in brain tissue (Holthoff and Witte, 1998; Duarte *et al.*, 2003, Holtkamp *et al.*, 2003). In the present study, we investigate the effect of NaBr on NEA. We simultaneously monitored field potential and IOS. Investigations about the effect of chloride blocker application were also carried out.

## Methods

### Preparation of hippocampal slices

The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Federal University of São João del-Rei. All recordings were carried out in the dentate gyrus (DG) granular layer, infrapyramidal subfield, of hippocampal slices prepared from Wistar rats (four to six weeks old). Rats were anesthetized using ethyl ether and decapitated. The brain was rapidly removed, hemispheres separated for isolation of each hippocampus and immediately

transferred to a chopper. Slicing was performed in cold ( $3 - 4^{\circ}\text{C}$ ), oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing in mM 127 NaCl, 2 KCl, 1.5  $\text{MgSO}_4$ , 1.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucose, pH balanced at 7.4 and oxygenation was maintained with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . The resulting slices ( $400\ \mu\text{m}$ ) were allowed to recover for 40 min in a perfusion chamber containing ACSF (temperature  $33 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ). After that they were transferred to an interface chamber and kept under the same conditions.

### **Drugs and solutions**

The following solutions were used throughout the study. Zero-added  $\text{Ca}^{++}$  ACSF containing (in mM) 127 NaCl, 7 KCl, 1.5  $\text{MgSO}_4$ , 1.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 glucose, pH balanced at 7.4 and oxygenation (95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ ). Bromide solutions were prepared in four different concentrations (5, 7, 9 and 11 mM of NaBr) added to the zero-added  $\text{Ca}^{++}$  ACSF by  $\text{Cl}^-$  substitution. SITS solution (4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid - Sigma Chemical, St Louis, MO) was prepared adding 1 mM to the zero-added  $\text{Ca}^{++}$  ACSF composition.

### **Extracellular field and intrinsic optical signal recordings**

Extracellular field potentials recordings were made using glass micropipettes (2-5  $\text{M}\Omega$ ) filled with 1 M NaCl. Signals were amplified with an AI  $402 \times 50$  pre-amplifier (Axon Instruments) connected to a Cyberamp 380 amplifier (Axon Instruments), and digitized with an AD converter (National Instruments), controlled by a computer system based on LabView Platform (National Instruments). developed in our laboratory.

Slices were transilluminated from below using a halogen lamp from the illuminating system of upright binocular microscope (model SMZ 1500 – Nikon, Japan). To improve quality of the images, the slices in the interface chamber were maintained resting on a milipore membrane (Milipore) allowing the white light to pass through the slice and providing a clear identification of the layers. All video images were captured using a CCD camera (Cool SNAP-Pro cf 1.4 megapixel cooled, USA), and stored on videotape using a VHS video-recorder (model VR 4236 HZ, Zenith, Brazil) and off-line converted to .AVI format at 12.5 MHz ratio into  $480 \times 640$  pixels per line. It was employed a frame-grabber board (DC10 Plus, Pinnacle, USA), controlled by an acquisition software (Pinnacle Studio Version 8.12, Pinnacle, USA). All the images were captured at a rate of 30 fps. The electrographic signal was used to control the range of frames to be captured.

To obtain images of light transmittance changes (LTC), calculations were carried as described by Andrew et al. (1996). Briefly, averages of corresponding pixels of the first 50 frames, before the wave propagation, formed the control image ( $T_{\text{cont}}$ ), which was subtracted,

pixel by pixel, from each subsequent experimental image ( $T_{\text{exp}}$ ). The resultant image of this subtraction was divided, pixel by pixel, by the  $T_{\text{cont}}$ . Specifically

$$LTC = \frac{(T_{\text{exp}} - T_{\text{cont}})}{T_{\text{cont}}}$$

Using a gray intensity scale, series of LTC images revealed areas of the slice where light transmittance changes over the time. To quantify neuronal recruitment, along the granular layer of DG, we drew polygonal, for each slice analyzed. The length of the polygonal portion pertinent to the recruited region was defined as the recruitment length (RL).

## Results

### Bromide effect on nonsynaptic epileptiform activity in the dentate gyrus

As described in previous studies (Jefferys and Haas, 1982; Taylor and Dudek, 1982 and 1984; Yaari et al. 1986), incubation of slices in zero-added  $\text{Ca}^{++}$  ACSF (Pan and Stringer, 1996; Xiong and Stringer, 2000) resulted in induction of spontaneous NEAs that remain stable for at least 2h. Typical features of field potentials and IOS image before NaBr application are shown in figure 1A. In figure 1B, IOS images corresponding to an instant of time along the events, indicated as '1' and '2', show that the neuronal recruitment, indicated by the white region, is restricted to the infrapyramidal lamina. When bromide was applied, field potentials morphology changed showing an increase in event frequency, and a decrease of their duration, with posterior disappearance of amplitudes. There was also a decrease of the DC shift. The period of time correspondent to simultaneous suppression of field potentials and IOS was assumed as the blockage duration (BD). BD depends on NaBr concentration as shown in figure 2. The sigmoidal function adjusted as the representative function for the BD dose-response indicates that for a full NEA blockage it is necessary at least ~9 mM of NaBr.

The RL for each bromide concentration is shown in figure 3. For each concentration (5mM, n=6; 7mM, n=6; 9mM, n=6; 11mM, n=6) is shown the RL of each event registered before, along and after the NaBr application. A curve described by a composition of two sigmoidal functions ( $RL(t) = A_1[\tanh(\tau_1(t - tc_1) + 1)] + A_2[1 - \tanh(\tau_2(t - tc_2))]$ ) was adjusted for each experiment through the gradient method. The values were normalized in respect to the mean average of the RL before bromide application. The mean average curve (continuous line) and SD interval curves (dashed lines superior and inferior, indicating the SD interval for each associated instant of time) were then calculate. For 5 mM of NaBr the reduction of the

recruited region happened only after ~2 min of NaBr application and there was no full suppression of IOS. However, at higher concentrations, as soon as NaBr was applied, the recruited region started to decrease and there was maintained suppression in the IOS throughout the application.

### **SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) effect on nonsynaptic epileptiform activity in the dentate gyrus**

Since it is very well established that chloride channels play an important role in the effect bromide on synaptic epileptiform activity, it is useful to investigate how blockers of this channels act on NEAs. CLC-2, one of the members of the chloride channel family is significantly expressed in the brain and can be activated by hyperpolarization and extracellular acidification (Jentsch et al., 2002). SITS, a chloride channel blocker, acts on CLC-2 and other types of chloride channels (Jentsch et al., 2002) and was used to test its effect. SITS experiments were similar to those with NaBr. It took ~15 min for SITS to have effect. Changes in field potentials, used for to monitor the occurrence of NEAs, showed tendency to exhibit changes similar to the ones observed with NaBr concerning duration, frequency and population spike amplitudes. The effect of SITS on recruitment, quantified by RL parameter was also similar to that of NaBr, except for the time course and time response (figure 4). The channels closed by SITS were able to suppress the events at the concentration of 1 mM. The blockage, although partial had longer effect.

### **Discussion**

The main purpose of this study was to verify the efficacy of NaBr on the blockage of nonsynaptic epileptiform activity induced by zero-added  $\text{Ca}^{++}$  ACSF. The minimal dose obtained for inducing the full blockage of the NEAS was 9 mM. Meierkord et al. (2000) found 11mM as the minimal dose. The different composition of ACSF as well as different regions studied by these authors may justify the difference in the dose-responses.

In all experiments we found that the frequency of epileptiform events increased progressively up to their blockage. Conversely, Meierkord et al (2000) verified decrease in the frequency and we have no explanation for this disagreement. This seems to be an interesting issue to be investigated in terms of its biophysical aspects.

The novelty of the present study is to investigate neuronal recruitment by means of IOS images. Quantification of RL by IOS was highly sensitive to the blockage effect of the used drugs. This is evident comparing NaBr effects on field potentials parameters with the effects on RL. Consequently, the similarity between the 5m NaBr and 1mM SITS groups

allowed previewing that this blocker can be even more effective for higher concentrations. The fact that SITS suppresses NEAs is accordance with Bikson et al. (1999), who showed a consistent suppression of NEA by application of NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) and DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2, 2'-disulfonic acid).

The biophysical aspects of chloride channels blockers on NEAs, inducing activity suppression, are of particular interest in unravelling the mechanisms that sustain these activities. Studies carried with experimental epilepsy models based on synaptic connections work with the hypothesis that the effect of bromide is due to the potentiation of inhibitory postsynaptic potentials by GABA. If GABA is still inhibiting in this kind of model, therefore, chloride is also contributing with its inhibitory effect. However, this seems not to be the case in the experiments we performed. The tendency of NEAs to be suppressed by chloride channel blockers suggests excitatory contribution of chloride ions. Otherwise, chloride channel blockers would act increasing the NEAs. Therefore, during NEAS, the possible role of chloride is to sustain neuronal depolarization.

The effect of bromide suppressing NEAs might have two origins. As it is widely accepted, bromide transmembrane concentration gradient can lead to a Nernst potential more negative than the transmembrane potential, therefore justifying its inhibitory effect. An additional effect of bromide may be related to the effect of chloride channels blockers. Due to competition with chloride in its channels, bromide may reduce the permeability of chloride channels, thus contributing for NEAs suppression.

### **Acknowledgements**

The study was supported by grants from CAPES (n°74/2005- project 0080055 - PROCAD) and CNPq.

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

We thank Prof. Mário Palma (UNESP- RIO CLARO) for providing us with the chloride channel blocker SITS.

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest.

## References

- Bikson M., Ghai R.S., Baraban S.C., Durand D.M. (1999) Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero-Ca(2+) model of epileptiform activity. *J Neurophysiol* 82:2262-2270.
- Duarte, M. A., Almeida, A. C. G., Infantosi, A. F. C., Bassani, J. W. N. Functional Imaging of the Retinal Layers by Laser Scattering: an Approach for the Study of Leão's Spreading Depression in Intact Tissue. *J. Neurosci. Methods* 2003; 123:139-51.
- Ernst JP, Dose H, Baier WK. Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. *Brain Dev* 1988;10(6):385-8.
- Franciolini F, Nonner W. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 1987;90(4):453-78.
- Holthoff, K., Witte, O. W., 1998, Intrinsic Optical Signals in vitro: A Tool to Measure Alterations in Extracellular Space with Two-Dimensional Resolution. *Brain Research Bulletin* 1998; 47(6): 649-55.
- Holtkamp, M., Buchheim, K., Siegmund, H., Meierkord, H. Optical Imaging Reduced Seizure Spread and propagation Velocities in Aged Rat in vitro. *Neurobiology of aging* 2003; 24: 345-53.
- Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting JS, Ernst JP. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol* 2007;22(4):414-8.
- Jefferys, J.G.R., Haas, H.L. Synchronized burstings of CA1 pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 1982 300: 448-450.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002;82(2):503-68.
- Joynt RJ. The use of bromides for epilepsy. *Am J Dis Child* 1974;128(3):362-3.
- Meierkord H, Grunig F, Gutschmidt U, Gutierrez R, Pfeiffer M, Draguhn A, et al. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361(1):25-32.
- Pan E, Stringer JL. Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties. *J Neurophysiol* 1996;75(1):124-32.
- Steinhoff BJ, Kruse R. Bromide treatment of pharmaco-resistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: a clinical study. *Brain Dev* 1992;14(3):144-9.
- Suzuki S, Kawakami K, Nakamura F, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1994;19(2):89-97.

- Taylor, C.P., Dudek, F.E. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science* 1982;218:810-812.
- Taylor CP, Dudek FE. Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. *J Neurophysiol* 1984;52(1):143-55.
- Woodbury DM, Pippenger CE. Bromides. In: Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, editors. *Antiepileptic drugs*. 2 ed. New York: Editora Raven; 1982. p. 797-801.
- Xiong, Z. Q., Stringer, J. L. Sodium Pump Activity, not Glial Spatial Buffering, clears Potassium after Epileptiform Activity Induced in The Dentate Gyrus, *J. Neurophysiol* 2000; 83: 1443-1451.
- Yaari, Y., Kornnerth, A., Heinemann, U. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. II. Role of extracellular potassium. *J. Neurophysiol* 1986; 56:424-38.

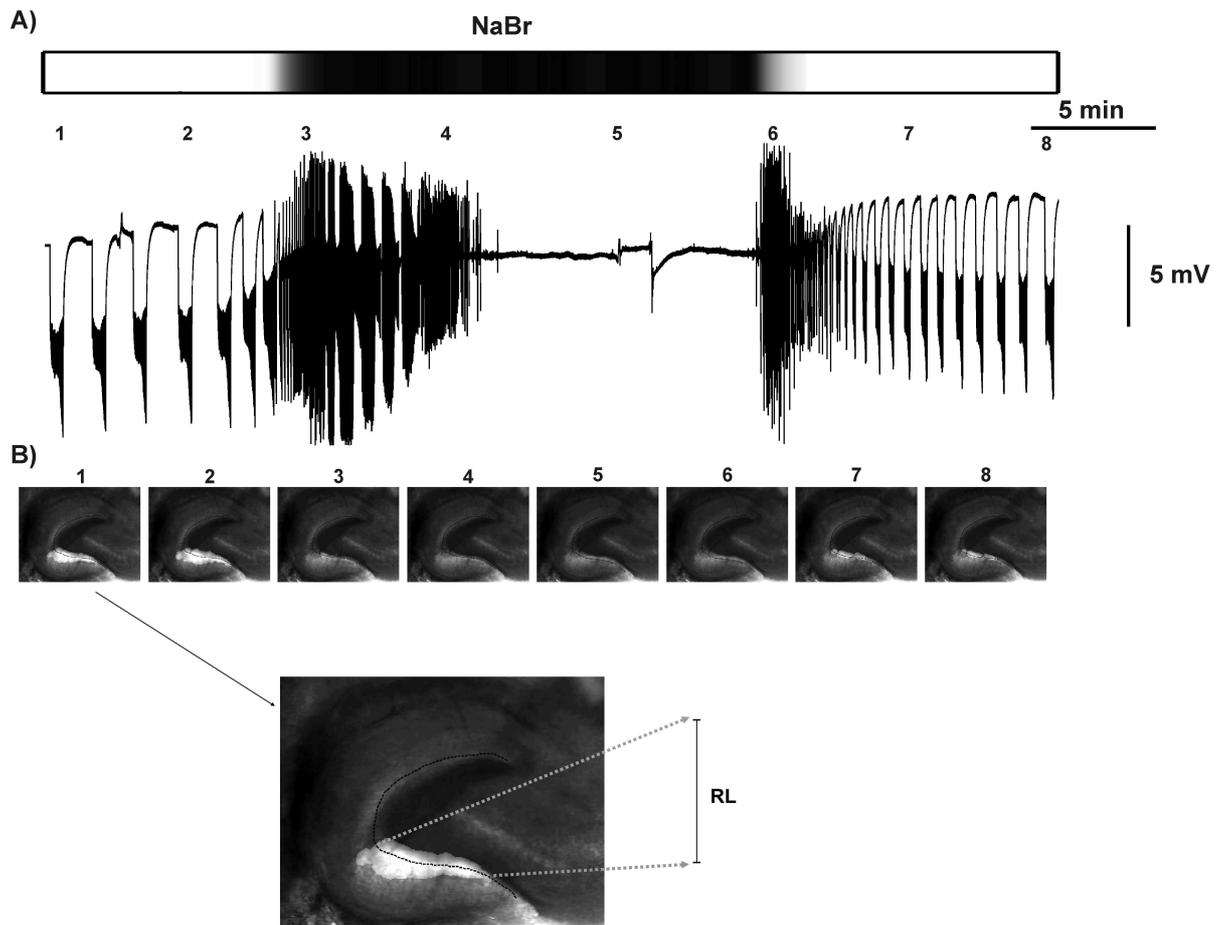


Figure 1: Typical simultaneous extracellular field potential and IOS images. (A) Extracellular field potential registered before, along and after (according to the bar indication) application of NaBr. The numbered instant of time correspond to the IOS images showed in (B), where the polygonal along of the granular layer of the DG is exemplified and also the corresponding RL used to quantify the recruited region (white area).

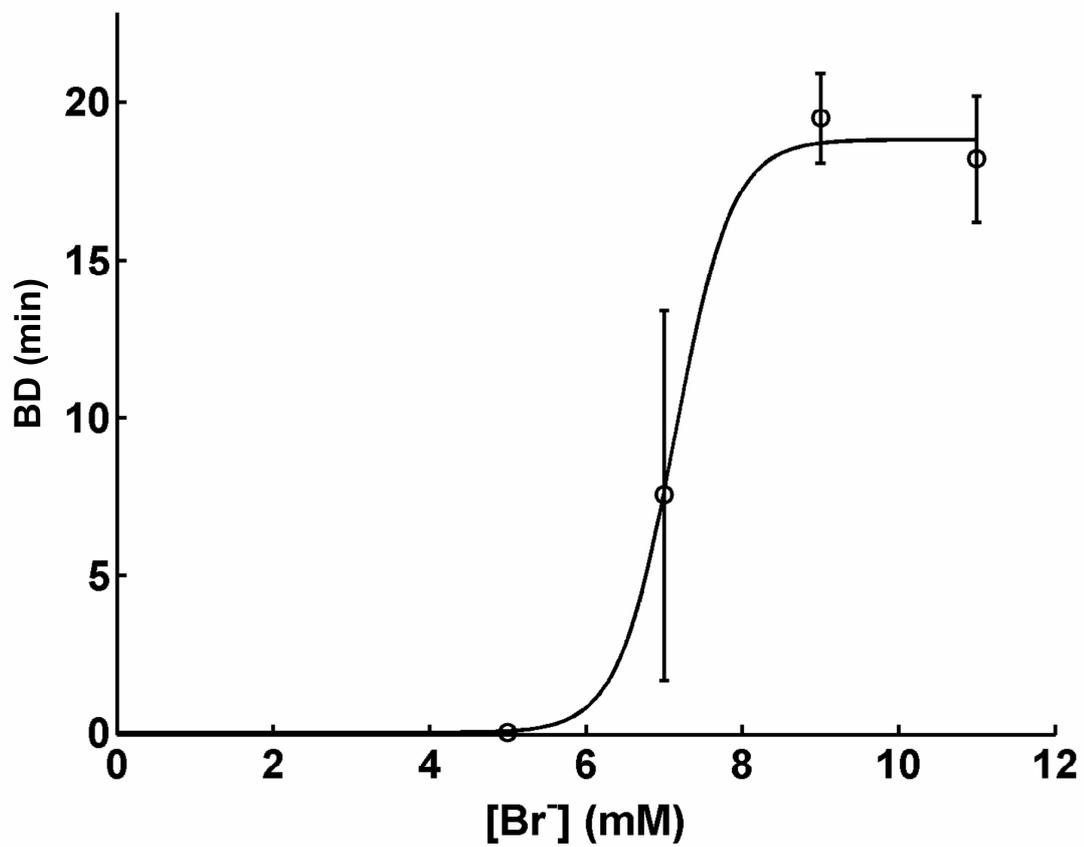


Figure 2: Dose-response curve for the bromide BD, fitted to the experimental data (circles) and the corresponding SD bars.

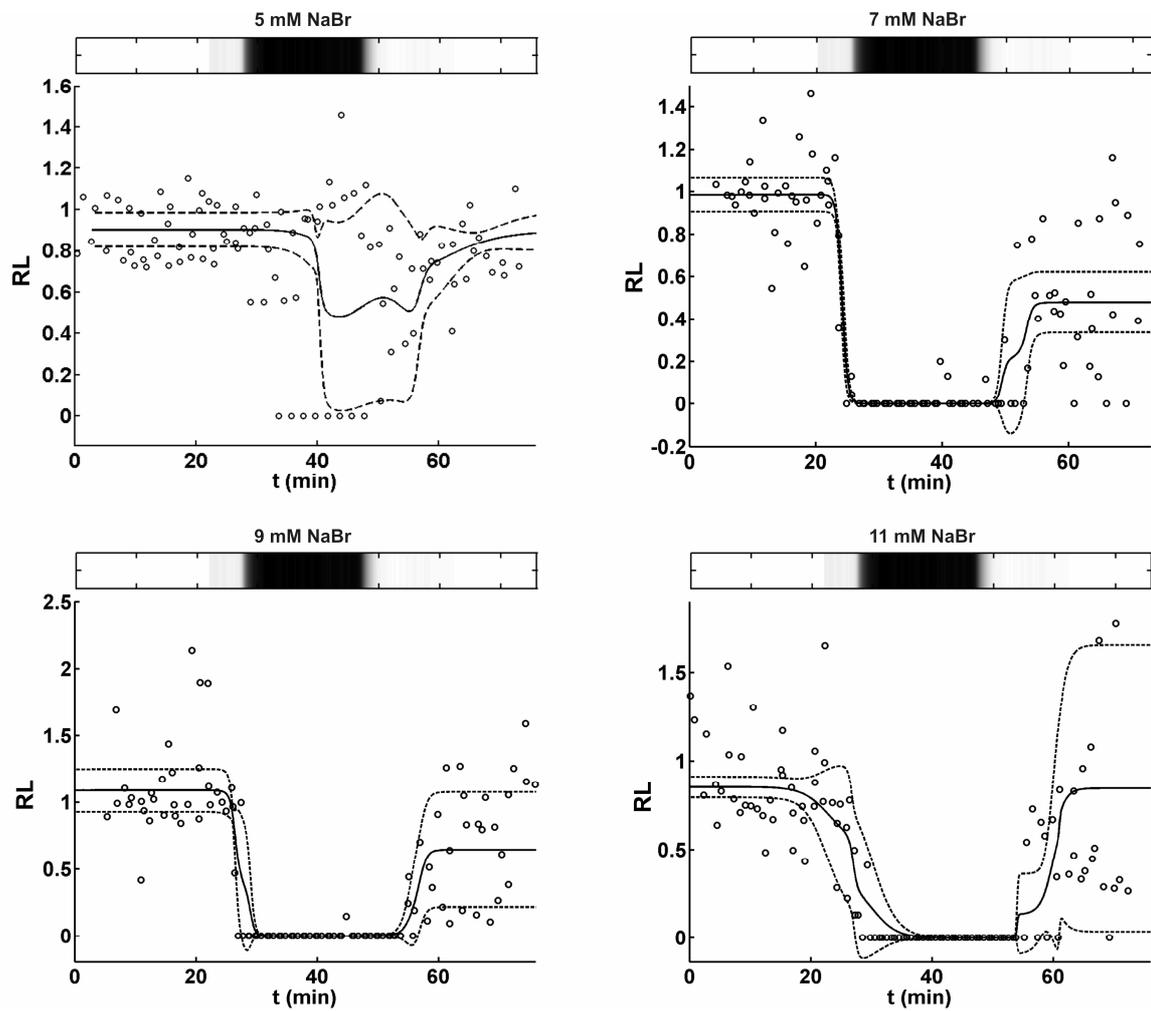


Figure 3: Normalized RL, measured for each event (circles), before, along and after NaBr application (according to the bar indication), for each concentration (5, 7, 9 and 11 mM) investigated. Continuous lines: mean average of all curves fitted to each experiment ( $n=6$  for each concentration). Dashed lines: SD interval for each instant of time.

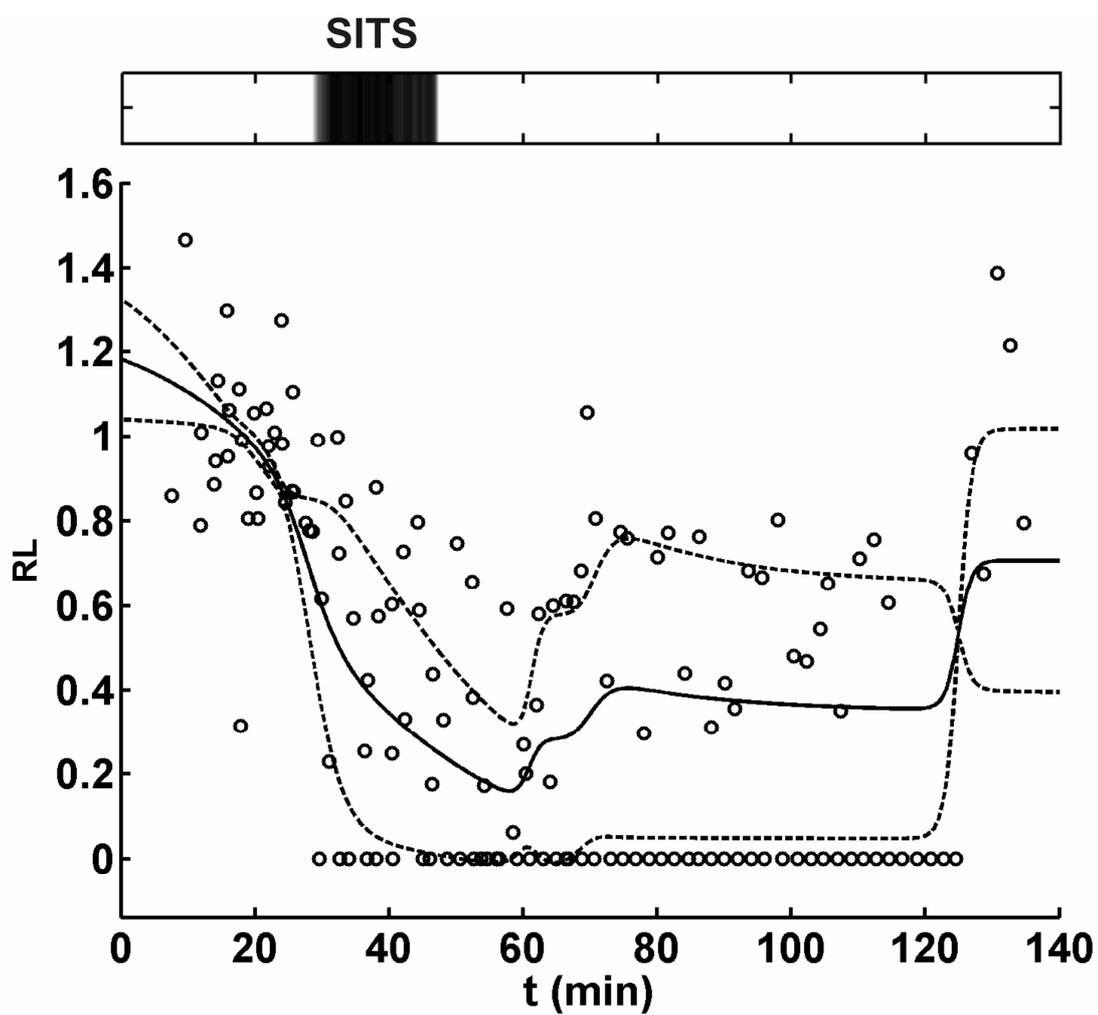


Figure 4: Normalized RL, measured for each event (circles), before, along and after SITS (1mM) application (according to the bar indication). Continuous lines: mean average of all curves fitted to each experiment (n=3). Dashed lines: SD interval for each instant of time.