

POTÁSSIO EXTRACELULAR E A REGULAÇÃO DO CLORETO INTRACELULAR
EM CULTURA ORGÂNICA DISSOCIADA DE NEURÔNIOS.

Mozar Dênio da Costa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTIDISCIPLINAR EM FÍSICA, QUÍMICA E
NEUROCIÊNCIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Aprovada por:

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
(Presidente)

Prof. Dr. Antônio Márcio Rodrigues

Prof. Dr. Carlos Júlio Tierra-Criolo

SÃO JOÃO DEL-REI, MG - BRASIL

JULHO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

COSTA, MOZAR DÊNIO
POTÁSSIO EXTRACELULAR E A
REGULAÇÃO DO CLORETO
INTRACELULAR EM CULTURA
DISSOCIADA DE NEURÔNIOS. [MG] 2009
XXIX, 67 p. 29,7 cm (FIQUINE/UFSJ,
M. Sc., Neurofísica, 2009)
Dissertação - Universidade Federal de São João
del-Rei
1.Patch-clamp. 2.Canais de cloreto. 3.Potencial de
Nernst do Cloreto.4.Cultura neuronal. 5.Epilepsia.
I. FIQUINE/UFSJ II. Título (série)

*O amor é paciente. Agüenta tudo.
Acredita em tudo.
Tudo espera.
Porque o amor é capaz de entender.*

(Henry Drumond)

Às Marias (Rosária e Bia)

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Antônio Carlos Guimarães de Almeida, pela oportunidade de desenvolver esse projeto e pela fundamental orientação para a realização do trabalho.

Ao prof. Antônio Márcio Rodrigues pelo auxílio inestimável com as simulações computacionais.

À Maristela de Oliveira, pelo auxílio inestimável durante a realização dos procedimentos experimentais e discussão da técnica. Maris, valeu mesmo!

Ao prof. João Domingos Scalon pelo apoio e oportunidade cedida para minha iniciação a pesquisa.

Aos companheiros de experimentação Fernanda, Vítor e Flávia, pela amizade e o apoio.

Aos colegas do laboratório Bruno, Gláucio, Maisinha, Mariana, pela colaboração na discussão dos resultados experimentais e de artigos relacionados.

A minha família, por todo carinho, atenção e apoio que sempre destinaram a mim.

Aos amigos João, Jussara, Rodrigo e Socorro, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Ao pessoal do LANECS e da república ASPONE pela amizade e pelos bons momentos que vivenciamos juntos. Pessoal, vou sentir saudades!

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo indispensável auxílio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à FIQUINE/UFSJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

POTÁSSIO EXTRACELULAR E A REGULAÇÃO DO CLORETO INTRACELULAR EM CULTURA DISSOCIADA DE NEURÔNIOS

Mozar Dênio da Costa

Julho/2009

Orientador: Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Programa: FIQUINE

Departamento: Engenharia Biomédica

Os mecanismos responsáveis pela transição entre os estados ictal e interictal de atividades epileptiformes são pouco conhecidos. ALMEIDA e colaboradores (2008), por meio de simulações computacionais, levantaram a hipótese de que a predisposição para sustentar as crises no giro dentado de fatias hipocâmpais, banhada com solução com alto potássio e zero cálcio se dá pelo aumento do $[Cl^-]_i$, induzido pela alta $[K^+]_o$. Essas alterações são correspondidas por alterações do E_{Cl^-} . Quando esse potencial é suficiente para ultrapassar o V_M , a excitabilidade é suficiente para sustentar crises espontâneas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar do potencial de Nernst de cloreto, por meio da técnica de patch clamp na configuração de patch perfurado, em cultura de células hipocâmpais dissociadas de neonatos de ratos wistar, sob a variação da $[K^+]_o$ (3 e 8,5 mM). Foram analisadas 117 células evidenciando E_{Cl^-} 's mais positivos que os V_M 's em ambas as concentrações de potássio. Os resultados obtidos foram interpretados utilizando-se simulação computacional. A análise comparativa dos resultados experimentais e simulações sugerem que, nas culturas, ocorre redução importante na expressão de cotransportadores do tipo NKCC e alterações na afinidade dos KCC2's. Estes cotransportadores devem reduzir as afinidades de seus sítios extracelulares e aumentar as afinidades dos sítios internos

POTÁSSIO EXTRACELULAR E A REGULAÇÃO DO CLORETO INTRACELULAR EM CULTURA DISSOCIADA DE NEURÔNIOS

Mozar Dênio da Costa

Julho/2009

Advisor: Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Program: FIQUINE

Department: Biomedical Engineering

The mechanisms responsible for the transition between the ictal and interictal states of epileptiform activities (EA's) are not well known. ALMEIDA et al (2008), by computation simulation, proposed these mechanisms, specifically involving the dentate gyrus of the hippocampus, during EA's induction and sustaining with high potassium and low calcium in the bath solution. It is proposed that excitability is increased *per se*, but also, because of the associated exchanges of Cl^- , altering the corresponding Nernst potential (E_{Cl^-}). When this potential overtakes the resting potential, the excitability is enough to sustain spontaneous activity. The aim of this work is to study of Nernst potential, by means of the patch clamp technique, using the perforated patch configuration, in rats hippocampus neurons culture, altering $[\text{K}^+]_o$ (3 e 8,5 mM). On the 117 cells analysed, the E_{Cl^-} 's was more positive than V_M 's in both potassium levels. The results were interpreted comparing experimental findings with computational simulations. The comparative analysis suggest that, in neuronal cultures, happen an important reduction in the NKCC expression and changes in KCC2 affinity. Specifically in these cotransporters it is presumed a reduction of the affinity of the extracellular site and increase of the intracellular site.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	01
II.	REVISÃO DE LITERATURA	04
	II.1 – EPILEPSIAS	04
	II.2 – HISTÓRICO	06
	II.3 – CLASSIFICAÇÕES	07
	II.3.1 – Epilepsias Refratárias	09
	II.4 – HOMEOSTASE DO CLORETO.....	11
	II.4.1 – Mecanismos de transporte	11
	II.4.2 – Cotransportadores	14
	II.4.3 – Desenvolvimento neuronal	16
	II.5 – MODELO DE HIPERSINCRONIA INDUZIDO POR ALTO POTÁSSIO.....	18
	II.5.1 – Alterações no potencial reverso do potássio	20
	II.5.2 – Redução do espaço extracelular	20
	II.5.3 – Sistema GABAérgico	21
	II.6 – ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO SINÁPTICAS	22
III –	OBJETIVOS	25
IV –	METODOLOGIA	26
	IV.1 – ESCOLHA DE ANIMAIS	26
	IV.2 – DISSECÇÃO DE FETOS	26
	IV.2.1 – Dissociação dos hipocampos e plaqueamento	27
	IV.2.2 – Armazenamento e Manutenção das Culturas	28
	IV.3 – SETUP	29
	IV.3.1 – Controle Óptico e Microscópio	33
	IV.3.2 – Injeção de Drogas	33
	IV.3.3 – Fabricação de Pipetas	33

IV.3.4 – Amplificadores	34
IV.3.5 – Soluções Aplicadas na Eletrofisiologia	35
IV.5.1 – Solução de micropipeta	35
IV.5.2 – Soluções de banho e estímulo	35
IV.5.3 – Protocolo de aplicação de soluções	37
IV.3.6 – Clampeamento de voltagem	37
IV.6.1 – Potencial de Nernst para o cloreto	38
IV.4 – TRATAMENTO DE DADOS	39
IV.4.1 – Critério de escolha dos Potenciais de Nernst	39
IV.4.2 – Análise estatística	40
V – RESULTADOS	42
V.1 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE APLICAÇÃO DE GABA	42
V.2 – EFEITO DAS DIFERENTES $[K^+]_o$ SOBRE V_M e E_{CL}	43
V.3 – SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL	45
VI – DISCUSSÃO	50
VII – CONCLUSÕES	52
VIII – PROPOSTA DE CONTINUAÇÃO DO TRABALHO...	53
IX. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
AE	Atividade Epileptiforme
AENS	Atividades Epileptiformes Não Sinápticas
CCC	Canais Cotransportadores de Cloreto
CE	Crise Epiléptica
E_{Cl}	Potencial de Nernst para o Cloreto
EEG	Eletroencefalograma
ER	Epilepsias Refratárias
ELT	Epilepsia de Lobo Temporal
GABA	Ácido Gama-Aminio Butírico
KCC	Cotransportador de Cloreto e Potássio
ILAE	Liga Internacional contra a Epilepsia
NKCC	Cotransportador de Sódio, Potássio e Cloreto
RM	Ressonância Magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
V_M	Potencial de Membrana
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons
UFSJ	Universidade Federal de São João del Rei

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição
II.1	Representação esquemática da transmissão sináptica entre neurônios
II.2	Representação de um canal iônico inserido na bicamada lipídica
II.3	Esquema de funcionamento da bomba de sódio/potássio
II.4	Modos básicos de cotransportadores de cloreto secundariamente ativos
II.5	Esquema de funcionamento de cotransportadores de cloreto
II.6	Esquema de modificações na homeostasia do cloreto durante a maturação
II.7	Representação esquemática do hipocampo de rato sob um corte transversal
II.8	Representação de crises espontâneas induzidas por alta $[K^+]_o$
II.9	Modificações nas condutâncias iônicas durante crises
IV.1	Esquema de retirada do encéfalo da calota craniana
IV.2	<i>Setup de patch clamp</i>
IV.3	Micromanipuladores
IV.4	Mesa de fixação de micromanipuladores
IV.5	Disco para acomodação de placas de cultura
IV.6	Sistema de injeção de soluções de pequeno volume
IV.7	Sistema de injeção de soluções de grande volume
IV.8	Puxador de pipetas horizontal
IV.9	Protocolo de estímulo de potencial
IV.10	Curvas IxV de células neuronais na presença de GABA

Figura	Descrição
V.1	Cura de corrente evocada por GABA
V.2	Diagrama de caixas para os potenciais
V.3	Probabilidade normal de resíduos
V.4	Representação esquemática de uma rede de unidades funcionais, estrutura básica do modelo de Almeida e Cls. (2008)
V.5	Reprodução qualitativa das alterações no potencial de Nernst do Cl (E_{Cl}) em função de alterações na $[K^+]_o$ com redução na permeabilidade do potássio.
V.6	Reprodução qualitativa das alterações no potencial de Nernst do Cl (E_{Cl}) em função de alterações na $[K^+]_o$ com redução na atividade do potássio e do cloreto.
V.7	Variações sofridas nos E_{Cl} - VM, nas $[K^+]_i$, $[Na^{2+}]_i$, e $[Cl]_i$ e, na atividade da bomba de Na^{2+}/K^+ e nos KCC's durante as modificações na $[K^+]_o$.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição
IV.1	Solução salina utilizada na cirurgia
IV.2	Meio Essencial Mínimo
IV.3	Solução Interna Padrão
IV.4	Solução Externa Padrão
IV.5	Solução para o protocolo com cultura
V.1	Relação de número de células experimentadas
V.2	Potenciais de Nernst e de membrana

I. INTRODUÇÃO

A ocorrência de descargas paroximais é acompanhada por mudanças significantes na distribuição iônica do espaço extracelular. Trabalhos apontaram que crises focais induzidas em modelos experimentais eram precedidas de redução na concentração extracelular do íon cálcio ($[Ca^{2+}]_o$) (KRNJEVIC et al., 1980; HEINEMANN et al., 1984). Semelhantemente, trabalhos posteriores (TAYLOR E DUDEK, 1982) mostraram que esta redução poderia ser responsável por sustentar atividades epileptiformes mediadas por mecanismos não sinápticos, ou, de forma sintética, atividades epileptiformes não-sinápticas (AENS) e que estes mecanismos eram suficientes para sustentar as crises epiléticas (KONNERTH et al., 1986). Contudo, alterações $[K^+]_o$ durante as crises (BIKSON et al., 2002), como reportado para os experimentos de SCHWEITZER (SCHWEITZER et al., 1992), ocorrem quando o potássio atinge níveis de 9 mM.

Apesar de todo o conhecimento sobre a dinâmica iônica, durante as crises e sua manutenção, ainda permanece obscuro como o início e término das descargas epilepticas, sustentadas por conexões não sinápticas, acontecem e quais são os principais mecanismos responsáveis pela transição do estado interictal para o estado ictal.

Sabe-se que as atividades de neurônios e glias baseiam-se em bombas e carreadores, que estabelecem os gradientes iônicos transmembrânicos, e em canais iônicos, que geram correntes, promovidas pela eletrodifusão, e diferença de potencial entre os meios intra e extracelular, sustentada pelos gradientes iônicos transmembrânicos. No arranjo de neurônios e glias, quatro tipos de mecanismos não sinápticos e comunicação estão envolvidos: Interações eletrotônicas, mediadas por junções do tipo gap (NAUS et al., 1991); Mudanças no espaço extracelular (ROPER et al., 1992); Campo elétrico (DUDEK et al., 1986); e Flutuações iônicas no meio extracelular (TAYLOR e DUDEK, 1982).

ALMEIDA et al (2008), por meio de simulações computacionais, envolvendo a representação de populações de neurônios e glias, na ausência de conexões sinápticas, e considerando interações celulares mediadas exclusivamente por mecanismos não-sinápticos, levantaram a hipótese de que a predisposição para sustentar as crises no giro dentado de fatias hipocâmpais, banhada com solução com alto potássio e zero cálcio se dá pelo aumento do $[Cl^-]_i$, induzido pela alta $[K^+]_o$. As simulações mostraram que a hipótese levantada pode ser explicada pelo equilíbrio homeostático mediado pela atuação conjunta de canais iônicos, cotransportadores e bomba de sódio-potássio. As alterações na homeostase são significativas no que tange aos gradientes transmembrânicos do íon

cloreto. Essas alterações são correspondidas por alterações do potencial de equilíbrio de Nernst para esse íon. Quando esse potencial é suficiente para ultrapassar o potencial de membrana, a excitabilidade é suficiente para sustentar crises espontâneas.

Evidenciar experimentalmente os mecanismos que estão envolvidos na hipótese proposta por ALMEIDA e colaboradores torna-se um exercício que lança mão de várias técnicas. Mais especificamente, os cotransportadores e canais de cloreto têm sido vastamente estudados pela técnica conhecida como *patch clamp*. Sua potencialidade pode ser notada nos vários trabalhos que versam sobre a regulação do cloreto durante o desenvolvimento em diversos tipos celulares (PAYNE et al., 1997; EBIHARA et al., 1995; KAKAZU et al., 2000; van BREDERODE et al., 2001; ZHANG, LIU E XU, 2008; DIYKOV et al., 2008; BALENA et al., 2008; PERKINS et al., 2006). Por meio desta técnica, o estudo do potencial de Nernst para o cloreto, objeto deste trabalho, configura-se uma maneira importante para o estudo das transições entre os períodos interictal e ictal

Para maior clareza na apresentação dos trabalhos desenvolvidos, os capítulos posteriores descrevem a revisão da literatura (capítulo II), os objetivos (capítulo III), a metodologia (capítulo IV), resultados (capítulo V), discussão (capítulo VI) e conclusão (capítulo VII)

No capítulo II, referente à revisão da literatura, são abordadas definições, etiologia, histórico, características e classificações das crises relacionadas às epilepsias. Faz-se um breve apanhado dos mecanismos envolvidos nas crises e sua sustentação. O enfoque é voltado ao íon cloreto e os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Ainda nesse capítulo, uma breve revisão da técnica de *patch clamp* foi abordada, sendo seus detalhes técnicos matéria do capítulo IV.

O capítulo III é destinado aos objetivos deste trabalho, o qual foi alcançado mediante a metodologia explanada no capítulo IV. A metodologia envolveu o protocolo experimental para obtenção de culturas primárias dissociadas de hipocampus de neonatos, técnica de *patch clamp* perfurado com gramicidina, para estimativa do potencial de Nernst de cloreto. Todos os protocolos de aplicação de estímulos e tratamento de dados foram descritos no capítulo IV.

Os resultados do trabalho são apresentados no capítulo V, permitindo uma comparação entre os potenciais de Nernst para o cloreto e as simulações computacionais. Nesse capítulo, também são discutidos critérios de triagem dos dados. Posteriormente, no

capítulo VI, os resultados foram comparados aos já existentes na literatura e hipóteses foram confrontadas com as de outros

As conclusões são apresentadas no capítulo VIII, bem como as propostas de continuação do trabalho.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 - EPILEPSIAS

O termo epilepsia faz referências a distúrbios ocorridos no cérebro, com ocorrências de atividades elétricas altamente sincronizadas, periódicas e espontâneas, acompanhadas, em muitos casos, de manifestações comportamentais (TAYLOR E DUDEK, 1982; McNAMARA, 1994). Esse tipo de desordem acomete cerca de 1 a 2% da população mundial, sendo sua maior incidência na infância e na velhice (MCNAMARA, 1994; ANNEGRS et al.; 1998; HAUSER E HERDORFFER, 1990).

Normalmente, um paciente é diagnosticado como portador de Epilepsia quando ele apresenta, na ausência ou abstinência de drogas, pelo menos uma crise, acompanhada de alterações permanentes no cérebro, que aumentem sua susceptibilidade a outras crises. É necessário, também, que a esse quadro esteja associado um distúrbio neurobiológico, cognitivo, psicológico ou social (FISHER et al. 2005).

Uma crise epiléptica (CE) pode ser resultado de diversos fatores, como febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação e alterações vasculares. Comumente, são acompanhadas de movimentos involuntários, ataxia e perda de consciência, o que pode levar a lesões e até mesmo a morte. Embora muitos dos casos sejam controláveis por intervenção medicamentosa, cerca de 50% dos casos ainda permanecem refratários às intervenções médicas, comprometendo a qualidade de vida de milhares de pessoas (HAUSER e HESDORFFER, 1990). Além dos danos fisiológicos que a patologia pode gerar, CE's podem também gerar diversas psicopatologias como: psicoses, alucinações, ansiedade e transtornos do humor (OLIVEIRA, PARREIRA E DORETTO, 2007).

A expressão das crises depende da parte do cérebro em que as atividades sincrônicas se desenvolvem (RIGGS e RIGGS, 2005). As CE's podem ocorrer em diversas regiões do cérebro e podem provocar atividades motoras anômalas, alterações sensoriais e perda de consciência. Os ataques ou crises focais são os mais comuns, neles participam somente uma parte da população neuronal. Durante essas crises, a pessoa pode não perder a consciência, mas pode experimentar outros sintomas como convulsões, taquicardia e surtos mentais como alucinações.

CE's geralmente estão associadas com quadros clínicos associados a diversos fatores que dizem respeito ao padrão de recorrência, à origem da CE, idade de início dos eventos epilépticos, pré-disposição genética, padrões eletroencefalográficos e prognóstico de epilepsia. Nesse sentido, baseando-se nas características deste quadro, cada paciente é determinado como portador de um tipo específico de síndrome.

Existem hoje diferentes formas de se tratar as síndromes epilépticas tais como: as intervenções não-medicamentosas, cujas principais são a dieta cetogênica (ELKIS, 2002), a estimulação do nervo vago (FREEMAN et al. 2000; THEODORE e FISHER 2004), a farmacoterapia (COSTA et al., 1998) e os procedimentos cirúrgicos. Essas formas de tratamento podem controlar parcialmente os ataques dos pacientes com epilepsia, durante certo tempo.

A dieta cetogênica consiste da limitação do consumo de calorias e estabelece uma proporção entre gorduras, carboidratos e proteínas. Seu objetivo principal é estender os efeitos benéficos do jejum (ELKIS, 2002). Diferente disto, no caso cirúrgico, visa-se resseccionar o foco epileptogênico. Assim sendo, a determinação precisa do foco é crucial para o sucesso da cirurgia, portanto é recomendada, principalmente, a pacientes com crises de origem focal. Quanto aos tratamentos medicamentosos, estes, em geral, buscam diminuir a excitabilidade neuronal, aumentando o tônus inibitório ou diminuindo o excitatório. A eficácia no tratamento é resultado da associação entre o diagnóstico do foco da síndrome com os mecanismos de efeito de cada droga. Podemos, assim, citar: i) aumento da inibição GABAérgica pelo barbitúrico fenobarbital, ao prolongar a abertura dos canais de cloreto (MERCADO, MOUNT e GAMBA, 2004); ii) diminuição da excitabilidade neural pela fenitoína, interferindo, sobretudo, no transporte de sódio através da membrana (GARZON, JORGE e LIBERALESSO, 2004); iii) diminuição da condutância de membrana para o sódio, induzida pela carbamazepina (COSTA et al., 1998); e, ainda, iv) os efeitos do ácido valpróico, que se especula ser capaz de elevar os níveis de GABA no sistema nervoso central (YACUBIAN 2005).

II.2 - HISTÓRICO

“homens devem saber que do cérebro e, somente do cérebro, vem seus prazeres, desejos e comportamento, bem como sua tristeza, dor, aflições e lágrimas. Passando por isso, nós pensamos, vemos, ouvimos e distinguimos o que é feio do bonito, o ruim do bom, o prazeroso do desprazeroso...”

Hipócrates

Recorrências de escritos sobre a epilepsia datam de aproximadamente três milênios, época na qual, acredita-se, ser de origem o *Sakkiku*, tábuas de argila com inscrições em assírio-babilônico, nas quais havia inscrições de acontecimentos de muitas características de manifestações clínicas de epilepsia, tais como: convulsões generalizadas, repetitivas ocorrências de status epiléptico, crises motoras e sintomas sensoriais como alucinações e aura epigástrica (ENGEL, 2008). Importante ressaltar que, a princípio, as crises eram relatadas como originárias de possessão de demônios, as quais se manifestavam de diferentes maneiras sendo, portanto, descritas de acordo com o tipo de manifestação.

Em meados de 400 a.C., Hipócrates, em seu trabalho “Na doença sagrada”, usou do termo *epilhyia* (do grego acometer-se ou surpresa) para referir à epilepsia e, ainda, propôs uma nova visão para a patologia, dissociando-a da religião, argumentando, forte e eloqüentemente, na forma de um tema de investigação e estudo médico (RIGGS e RIGGS, 2005; ENGEL, 2008). Em comum com essa proposição, vários cientistas abordaram o tema: Samuel-Auguste Tissot (1770), Jean Baumes (1787), Theodore Herpin (1867), William Richard Gowers (1881), Russel R Reynolds (1861), Frederic e Erna Gibbs (1941), William Gordon Lennox e Margaret Lennox (1960) (RIGGS e RIGGS, 2005).

A visão de epilepsia e suas crises, com uma abordagem mais próxima daquela de Hipócrates, começou, realmente, a surgir durante o período renascentista. Contudo, o iluminismo foi a época em que, realmente, tomou porte, induzida pelos avanços ocorridos na anatomia, patologia, química, farmácia e fisiologia. A evolução do conhecimento sobre o transtorno se deve a nomes como Hipócrates, Galeno, Arateus, Avicena, Paracelsus, Willis, Boerhaave. Além deles, Tissot, que teve grande importância para os avanços, uma vez que idealizou as disfunções cerebrais crônicas como fatores de predisposição e deveriam ser distinguidas das causas associadas à epilepsia, denominou epilepsia idiopática aquela provocada por algum dano no cérebro, e por epilepsia essencial aquela devido a fatores externos (ENGEL, 2008). Contudo, apesar de todos os avanços, a relação com o sobrenatural ainda era presente, tendo, realmente, seu declínio somente em meados

do século XIX, quando começaram a ser descobertas as primeiras drogas com eficácia no tratamento da doença.

O fenobarbital e diversos sais de brometo foram utilizados no tratamento das crises. A inserção do uso de modelos experimentais com animais demonstrou-se essencial para o avanço do conhecimento de diversas patologias cerebrais e para a avaliação de abordagens terapêuticas, cirúrgicas e medicamentosas para a desordem epiléptica, como foi o caso de compostos como o valproato, gabapentina, lamotrigina, topiramato e oxacarbazepina. Os modelos experimentais tornaram-se base também para o entendimento de toda a geração e funcionamento da epilepsia, nas diversas regiões cerebrais, possibilitando hoje seu diagnóstico acurado e um tratamento mais efetivo.

II.3 - CLASSIFICAÇÕES

O quadro de classificações para a epilepsia, suas crises e síndromes mais atual é resultado do trabalho desenvolvido pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE). No entanto, mesmo antes de sua existência, classificações já haviam sendo praticadas desde a definição de desordens cerebrais, como epilepsia, praticada por Hipócrates (DARAS et al., 2008). Contudo, as maiores tendências ao modelo atual foram apontadas a partir de 1950, quando as várias terminologias criadas e o conhecimento mais aprofundado dificultavam, dentre outros parâmetros, a comunicação (DARAS et al., 2008). Na tentativa de sanar este problema, a ILAE propôs, em 1970, a primeira versão das classificações das crises e síndromes epiléticas.

Em princípio, o trabalho da ILAE relacionou eventos ictais com as desordens associadas, bem como inseriu padrões de eletroencefalograma (EEG) de eventos ictais e interictais, substrato anatômico, etiologia e idade, nas definições das crises (DARAS et al., 2008).

Atualmente, sabe-se que cada tipo de epilepsia tem em comum a característica de aumentar a excitabilidade neuronal, manifestada por meio da geração de convulsões. Estas, por si só, referem-se às alterações transitórias e anormais do comportamento, devido à atividade desordenada, descontrolada e, em alta frequência, de populações de neurônios no sistema nervoso central (SNC) (MCNAMARA, 1994, STRINGER et al., 1989). A maioria das epilepsias não tem, necessariamente, causa comum, ficando estabelecidos os termos idiopático, sintomático e criptogênico para caracterizar a etiologia das epilepsias. As epilepsias são consideradas idiopáticas, quando são transmitidas

geneticamente (não associadas a lesões cerebrais); como sintomáticas, quando as etiologias são identificadas e como criptogênicas, quando advém de etiologia não esclarecida (KANDEL, SCHWARTZ e JESSEL, 2000).

Sob o ponto de vista da fonte geradora, existem dois tipos de crises: CE's e crises não epiléticas (CNE's), sendo a primeira recorrente de um estímulo e a segunda com ausência deste. As crises ainda podem ser classificadas em dois grandes grupos: as parciais e generalizadas. Crises parciais são aquelas nas quais as atividades epiléticas (AE's) começam em uma parte determinada do cérebro. Portanto, as características das CE's dependem da parte cerebral de onde se originam e, ainda, podem ser subdivididas em simples e complexas. Crises generalizadas são aquelas que atacam todo o cérebro. Habitualmente, se manifesta com movimentos bruscos de todo o corpo. Se as AE's iniciam-se, primariamente, em todo o cérebro, são denominadas generalizadas, se originam secundariamente a uma crise parcial, denominam-se secundariamente generalizadas (ENGEL, 1989).

As crises parciais primárias abrangem transtornos de importantes classes genéticas e não geram nenhum dano na estrutura do cérebro. Nelas se encontram as alterações que induzem descargas elétricas cerebrais, oriundas de uma alteração da membrana, com ligações que correspondem a processos naturais, ao invés de canais de cálcio, cloro, aminoácidos e o ácido amino-butírico (GABA).

Durante um ataque generalizado, todo o cérebro é perturbado de uma forma difusa, o que provoca a aparição de sintomas mais importantes e a formação de eventos de maior duração. Normalmente, as crises generalizadas são acompanhadas de uma perda de consciência, que tem uma duração muito variável, podendo levar de segundos a horas (em casos do mal de Status Epilético). Esse tempo dependerá do subtipo de crise generalizada, que, ainda, pode ser classificada em primária (idiopática) e, por sua vez, dividida em seis subtipos: de ausência (pequeno mau), mioclônicas, tônicas, clônicas, tônico-clônicas (grande mau) e atônica (ARGENTONI, 2002).

Quanto à classificação sindrômica, as epilepsias parciais e generalizadas podem apresentar subdivisões quando seu foco é o lobo temporal. Este tipo de epilepsia tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, pela sua alta incidência e refratariedade medicamentosa. As Epilepsias de Lobo Temporal (ELT's) são alterações neurológicas, com ativação da área do córtex temporal, com repercussões de ordem neuropsicológica importantes, a serem consideradas na prática clínica, especialmente quando ocorre na

infância, repercutindo, principalmente, em alterações de linguagem e memória (SCHLINDWEIN-ZANINI, PORTUGUES e COSTA, 2007).

II.3.1 - Epilepsias Refratárias

As epilepsias refratárias (ER's) correspondem a cerca de 20% dos pacientes epiléticos, sendo que parte desses apresenta crises parciais complexas, que constituem o maior contingente passível de tratamento cirúrgico. Apesar dos vários fármacos desenvolvidos e aprovados e as opções não farmacológicas, até 30% dos pacientes permanecem refratários a esses tratamentos. Não obstante, a maior parte das drogas antiepiléticas está associada a efeitos adversos, especialmente em crianças, sendo alguns deles potencialmente graves, tais como prejuízo cognitivo, anemia aplasia e dano ao fígado (AIKEN e BROWN, 2000). Como já citado antes, dentre as síndromes epiléticas refratárias, a epilepsia do lobo temporal é a mais freqüente, acometendo 70% dos pacientes, e a lobectomia temporal corresponde a dois terços dos procedimentos cirúrgicos (SCHLINDWEIN-ZANINI, PORTUGUES e COSTA, 2007).

As ER's estão associadas com um aumento da morbidade – devido às CE's e à medicação – a isolamento social, déficits cognitivos e diminuição global na qualidade de vida (ARROYO, 2002). Adicionalmente, podem gerar uma desordem progressiva, devido ao efeito “*kindling*”. Nesse sentido, o controle precoce das crises epiléticas se torna importante para evitar o desenvolvimento de uma síndrome epilética completa.

Nos casos de doença refratários a intervenção terapêutica ou medicamentosa, o tratamento mais eficaz constitui do ato cirúrgico. Contudo, apesar dos resultados, a cirurgia não é aplicável a todos os pacientes. Em alguns casos esse procedimento pode resultar em lesões difusas ou comprometimento do córtex eloqüente. Outras desvantagens deste tipo de cirurgia estão associadas aos custos elevados e possíveis complicações relacionadas ao ato cirúrgico, tais como infecção e hemorragia cerebral.

Na infância, as síndromes epiléticas ocorrem de forma bastante polimorfa, tanto em suas manifestações clínicas, como na vulnerabilidade da expressão individual. Fatores relacionados com a maturação cerebral e neuromodulação, bem como os efeitos de estímulos por descargas paroxísticas sobre determinados circuitos neuronais em desenvolvimento, são responsáveis pelas diferentes expressões das epilepsias (SHIELDS, 2000). Dessa forma, há uma necessidade do diagnóstico precoce na delimitação de síndromes epiléticas relacionadas a um pior prognóstico, uma vez que, o conceito das

encefalopatias epilépticas centra-se no fato de que as próprias CE's e a reorganização das conexões excitatórias recorrentes em áreas susceptíveis à hipóxia e isquemia, como o hipocampo e algumas áreas neocorticais, podem ser determinantes no desenvolvimento de déficits cognitivos e motores associados às epilepsias grave, constituindo o que conceitualmente se conhece como “plasticidade cerebral negativa” (ELWES, JOHNSON e REYNOLDS 1988; SHIELDS, 2000).

Devido ao fato de estar associada à gravidade das lesões cerebrais precocemente adquiridas, a refratariedade da epilepsia na infância não é bem estabelecida. Contudo, estima-se que cerca de 20% a 30% dos casos oferecem resistência ao tratamento medicamentoso. Essa farmacoresistência está ligada às condições neuromaturacionais e fisiológicas, em que o cérebro se encontra, durante o desenvolvimento, com destaque para a elevada excitabilidade e diminuição de circuitos inibitórios mediados por GABA, visto que sinapses excitatórias surgem precocemente no curso do desenvolvimento cerebral. Assim, há o predomínio de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS's) em relação aos potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS's), tanto no hipocampo como em áreas extensas do neocórtex de ratos imaturos (MUSZKAT, RIZZUTTI e PEREIRA, 2002).

Tendo em vista esta relação entre PEPS e PIPS, o GABA exerce efeitos despolarizantes rápidos em cérebros neonatos, por meio a movimentação de cloreto (Cl) e bicarbonato (HCO_3^-) (KAILA, 1994; PAYNE et al., 1997, PAPP et al., 2008). Essa neurotransmissão ocorrida em imaturos tem efeito reverso em cérebros maduros (LUHMANN e PRINCE, 1991; KAKAZU, 2000; OKABE et al., 2003). Acredita-se que tal diferença seja resultado de mudanças maturacionais no gradiente iônico transmembrânico de cloreto, que governa o potencial de equilíbrio para canais de GABA (SANCHEZ e JENSEN, 2001). Acredita-se ainda que a despolarização promovida por GABA em neonatos possa estar envolvida na susceptibilidade a síndromes epilépticas refratárias durante a infância.

Parte dos estudos que visam o entendimento das ER's na infância usam como ferramenta de pesquisa modelos animais *in vitro*. Por meios deles, tem se mostrado a influência do sistema GABAérgico na despolarização neuronal em neonatos, durante crises ocorridas no SNC adulto e similaridades dos mecanismos durante as crises em adultos e neonatos (KAILA et al., 1997).

O uso de modelos animais para a indução de AE's permite aos pesquisadores controlar variáveis como: uniformidade genética, idade, circuitos que podem gerar crises epilépticas, características dos insultos que podem gerar epilepsia, o tempo entre as crises

epilépticas, além das alterações funcionais e estruturais relacionadas ao cérebro acometido por crises epilépticas. Tais modelos são classificados em agudos ou crônicos. Estes últimos versam anormalidades epileptiformes persistentes e podem ser induzidos por meio de lesões estruturais permanentes e estimulação elétrica repetitiva do cérebro, ou podem ocorrer espontaneamente em animais geneticamente epilépticos. Já os modelos agudos envolvem administração ou aplicação momentânea de substâncias convulsivas ou estímulos súbitos, que produzem AE's transitórias. Os modelos agudos são apropriados para a investigação de mecanismos de geração e sustentação das descargas epileptiformes, o quê, por sua vez, pode, em muitos casos, estar intrinsecamente ligado à regulação do íon cloreto entre os meios celulares.

II.4 - HOMEOSTASE DO CLORETO

As atividades elétricas no cérebro resultam de um delicado balanço entre as transmissões excitatórias e inibitórias nas sinapses. A neurotransmissão envolve a atividade de canais de cloreto dependentes de ligantes que geram respostas dependentes do nível de cloreto intracelular. Assim as concentrações de tal íon nos meios intra e extracelulares tem papel significativo na neurotransmissão (DELPIRE, 2000). O cloreto intracelular, juntamente ao bicarbonato, são os ânions livres mais abundantes nos neurônios. Seus equilíbrios interferem em funções celulares como a manutenção do pH, a regulação do volume celular, a sinalização, o crescimento, a migração e a estabilização do potencial de membrana.

A concentração intracelular de cloreto ($[Cl^-]_i$) é governada pela interação dos vários sistemas de transporte de anions que incluem desde canais a cotransportadores e extrusores (ALVAREZ-LEEFMANS, 2001). Assim, como o GABA atua ativando canais permeáveis a este íon, a neurotransmissão mediada por este ácido tem sido indicada como principal razão para a hiperexcitabilidade neuronal durante as CE's (OKABE et al., 2003).

II.4.1 - Mecanismos de Transporte

A membrana plasmática atua como uma barreira separando os meios intra e extracelular, de tal forma que a concentração iônica dentro da célula pode ser mantida em

níveis consideravelmente diferentes da concentração de íons dos fluidos extracelulares. Essa diferença de concentrações permite que a célula desenvolva funções vitais mediante a comunicação inter neuronal, que pode ser sináptica e não-sináptica.

A grande parte das comunicações é feita mediante as transmissões sinápticas ocorrida em regiões de contato especializadas denominadas sinapses (Figura II.1). Nelas, o terminal pré-sináptico, num primeiro neurônio, promove a liberação de transmissores químicos, os neurotransmissores, contidos em vesículas intracelulares, que são captados nos outros neurônios, por meio de receptores protéicos específicos, denominados terminais pós-sinápticos. Esses receptores podem se diferenciar em três tipos: ionotrópicos, metabotrópicos e tirosina quinase.

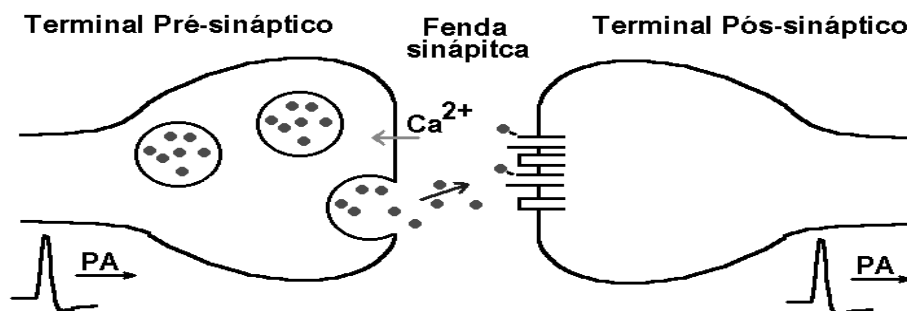


Figura II.1 – Representação esquemática da transmissão sináptica entre dois neurônios baseado no modelo utilizado por TUCKWELL E MIURA (1978). Os círculos preenchidos em cinza representam os neurotransmissores.

Receptores inotrópicos são canais iônicos que podem ser ativados por meio da ligação com moléculas neurotransmissoras, enquanto os receptores metabotrópicos estão funcionalmente acoplados a canais iônicos, ou a enzimas que sintetizam o segundo mensageiro intracelular, mediante uma proteína G. Os receptores quinase são os próprios efetores de quinases.

Os canais iônicos (Figura II.2) podem também ser encontrados em diferentes regiões da membrana, gerando permeabilidade seletiva na membrana para determinados íons. São caracterizados pelas altas taxas de transporte de íons (que podem chegar a milhões por segundo), quando comparados com outras proteínas de transporte. As células usam dos gradientes gerados por estas taxas de transportes para realizar várias funções celulares, incluindo a geração e propagação de potenciais de ação, no caso das células neuronais.

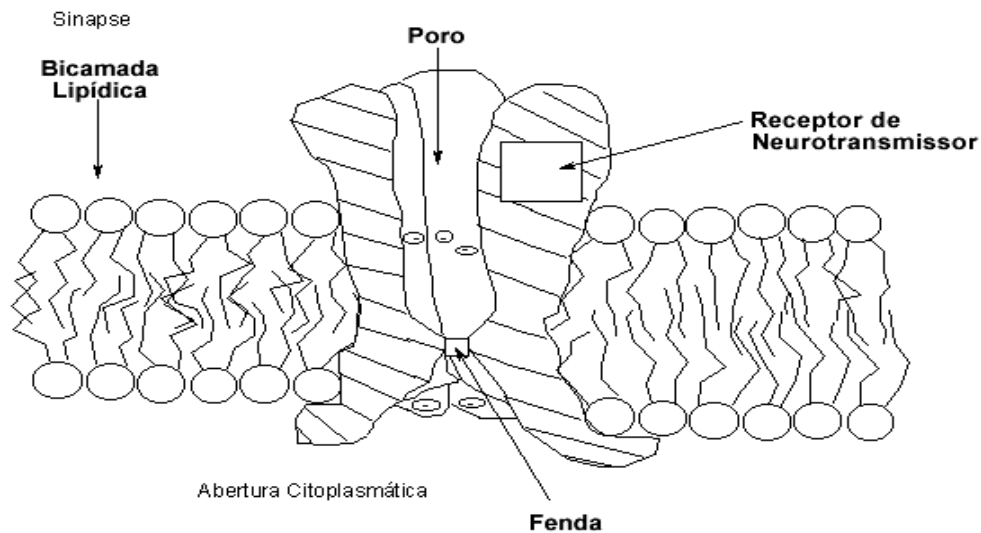


Figura II.2: Representação de um canal iônico inserido na bicamada lipídica celular. A fenda determina a seletividade para os íons e pequenas moléculas que entram no canal depois de sua ativação por neurotransmissores.

Adaptado de: <http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/toxicology/toxicologymoduleport.html>

A combinação de diferenças nas concentrações iônicas e a permeabilidade seletiva resultam na diferença de potencial elétrico (V_M) entre o citoplasma e o meio externo. O potencial que garante o equilíbrio eletroquímico de uma determinada espécie iônica é denominado potencial de Nernst (E).

No córtex de mamíferos, os canais iônicos metabotrópicos são ativados por ligantes extracelulares, como os receptores para neurotransmissores e os canais sensíveis a ácido. Nesse grupo, se encontram os canais ativados por GABA, normalmente responsáveis pela inibição das células neuronais. O GABA pode ser responsável por dois tipos de respostas pós-sinápticas: ativação da condutância de cloreto, por meio de receptores do tipo GABA_A e C e ativação da condutância do potássio, mediante receptores acoplados com proteínas G, denominados GABA_B.

Um terceiro grupo de canais iônicos é constituído por canais que são ativados pela alteração no potencial de membrana e são descritos como canais ativados por (ou dependentes de) voltagem. Esses canais exibem seletividade para um determinado íon fisiológico (por exemplo, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻), e são nomeados de acordo com esta seletividade (“canal para Na⁺”, “canal para K⁺”, etc.). O principal papel fisiológico destes canais é o seu envolvimento na geração de sinais elétricos ou químicos nas células (TERLAU e STÜHMER, 1998).

II.4.2 – Cotransportadores e Bomba de Na^+/K^+

Nos neurônios, os tipos de moléculas que transportam o cloreto através da membrana incluem extrusores eletroneutros de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que tem um importante papel na manutenção do pH intracelular (PAYNE et al., 2003), e uma família de cotransportadores de cátion-cloreto (CCC's), composta de um tipo de cotransportador de Na^+-Cl^- (NCC), dois de cotransportadores $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC1 e NKCC2) e quatro tipos de cotransportadores de K^+-Cl^- independentes de Na^{2+} (KCC1, KCC2, KCC3 e KCC4) (ALVAREZ-LEEFMANS, 2001; PAYNE et al., 2003; MERCADO, MOUNT e GAMBA, 2004;).

Todos os cotransportadores, bem como os extrusores, de Cl^- são responsáveis por transportes do tipo secundários. A energia consumida para seu trabalho provém da hidrólise de ATP nos processos de Na^+-K^+ ATPase - bomba Na^+-K^+ (Figura II.3) (ALVAREZ-LEEFMANS, 2001; PAYNE, STEVENSON E DONALDSON, 2003). Nesse processo a bomba de $\text{Na}^{2+}-\text{K}^+$ é responsável por extrair três íons de Na^{2+} , contrabalaneando com a entrada de dois íons de K^+ , mantendo, assim, baixas as concentrações de Na^{2+} intracelular.

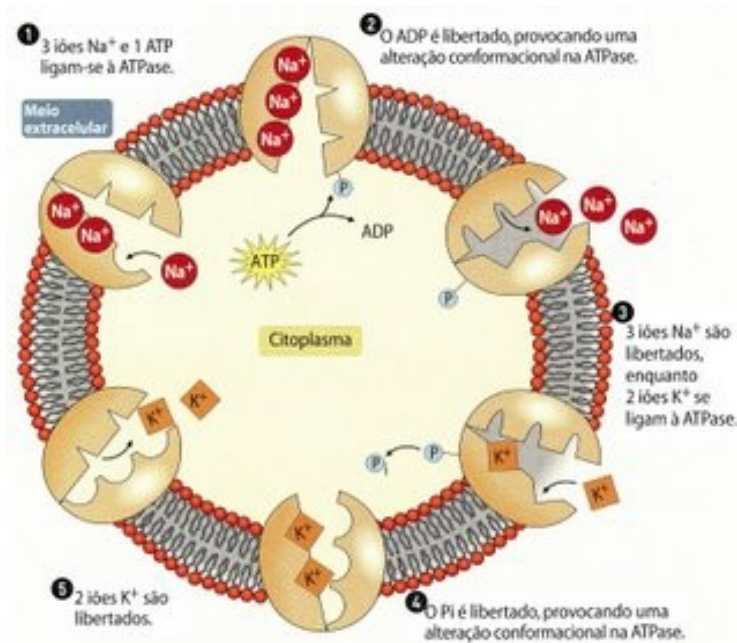


Figura II.3: Representação esquemática do trabalho realizado pela bomba de sódio. Mediada pelo ATP (Tri-fosfato de adenosina), a bomba se liga a 3 íons de Na^{2+} intracelulares. A hidrólise do ATP faz com que haja a fosforilação da bomba e liberação de ADP. Conseqüentemente, uma mudança conformacional na bomba expõe os íons de Na^{2+} ao exterior da membrana. Nesse estado conformacional, por afinidade, 2 íons de K^+ se ligam levando à desfosforilação da bomba. Outra molécula de ATP intracelular liga-se e à bomba reorientando-a para liberar os íons de potássio no interior da célula. Adaptado de: <http://bioepalc.blogspot.com/2008/04/difuso-simples-transporte-de-substncias.html>

Sob condições fisiológicas normais, o NCC e o NKCC de células maduras do SNC têm a função ativa de acumular Cl^- intracelular, enquanto que o KCC está envolvido na extrusão juntamente ao potássio (Figura II.4). Uma vez que são eletroneutros, os cotransportadores trabalham tanto na extrusão, quanto no influxo de íons, dependendo dos gradientes de concentração dos íons envolvidos. Outras proteínas de transporte secundariamente ativo também participam da homeostase do Cl^- , incluindo os extrusores de ânions dependentes e independentes de Na^{2+} (NDAE e EA, respectivamente) (PAYNE, STEVENSON E DONALDSON, 2003).

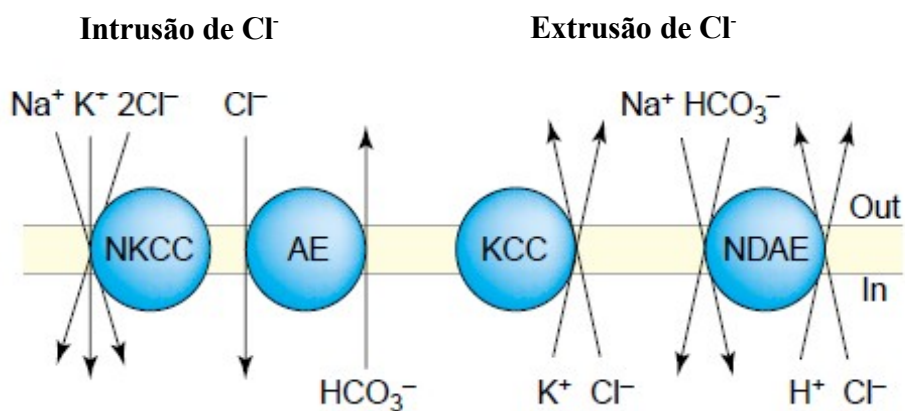


Figura II.4: Modos básicos de cotransportadores de cloreto secundariamente ativos de neurônios adultos, sob condições normais. À esquerda se encontra o NKCC, responsável pelo acúmulo de Na^+ , K^+ e Cl^- intracelular, na proporção de 1:1:2. Em seqüência, o AE, extrusor de ânion independente de sódio, o KCC, responsável pela extrusão de Cl^- e, o NDAE, extrusor de Cl^- dependente de sódio.

Retirado de: PAYNE, 2003

Quanto aos tipos de cotransportadores presentes no SNC, o NKCC1 é expresso não só em neurônios, mas também em células gliais (PAPP et al., 2008), enquanto o KCC2 constitui o KCC de maior expressão em neurônios maduros.(PAYNE et al., 1997).

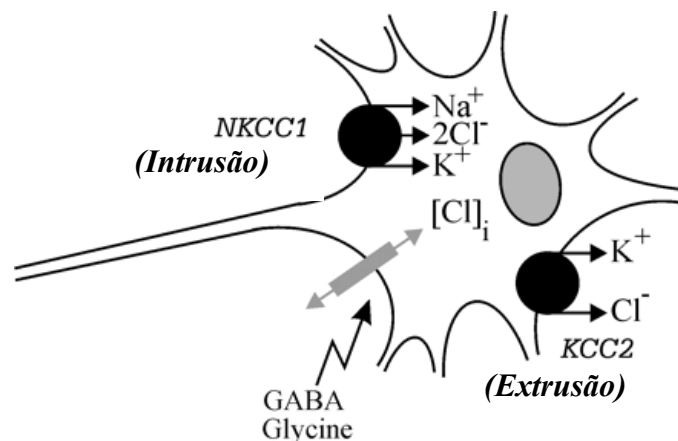


Figura II.5 - Representação da ação dos cotransportadores de Cl^- , expressa nos receptores GABA_A de neurônios do SNC. Enquanto o NKCC1 é responsável pelo cotransporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, o KCC2 media o transporte de $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$. Em condições normais, esse transporte é feito de forma que o NKCC1 funciona como intrusor e o KCC2 como extrusor de íons. Modificado de: DELPIRE (2000).

Em condições normais, as $[\text{Na}^{2+}]_o$ e $[\text{Cl}^-]_o$ permanecem em valores altos, enquanto a $[\text{K}^+]_o$ tem seu valor reduzido (Figura II.5). Esse balanço é promovido pela $\text{Na}^{2+} - \text{K}^+$ ATPase e pelos CCC's. A ativação dos canais de cloreto por GABA ativa os cotransportadores promove a ativação dos NKCC1 's, induzindo a entrada de cloreto juntamente a cátions e, conseqüentemente, a abertura de KCC2 produz a extrusão de potássio e cloreto, estabelecendo o círculo dinâmico entre os mecanismos de cotransporte e a bomba. Entretanto, essa dinâmica apresenta sensíveis diferenças quando se trata de neurônios de ratos neonatos, já que a expressão dos cotransportadores sofre alterações durante o desenvolvimento (RIVERA et al., 1999).

II.4.3 - Desenvolvimento Neuronal

Muitos trabalhos têm mostrado diferenças ocorridas nos CCC's, durante o desenvolvimento (KAKAZU et al., 2000; RIVERA et al., 1999; DELPIRE, 2000; MERCADO, MOUNT E GAMBA, 2004). Os primeiros dias pós-natal são acompanhados de uma redução na expressão de NKCC1 's e aumento na de KCC2 (CLAYTON et al., 1998). Dessa forma, os NKCC 's seriam responsáveis pela alta $[\text{Cl}^-]_i$ em recém nascidos enquanto os KCC 's pela diminuição desta concentração posteriormente. Assim sendo, a abertura de canais de cloreto, via liberação de GABA nos terminais pré-sinápticos, também será afetada convertendo os PEPS's em PIPS's (OWENS e KRIEGSTEIN, 2003).

As respostas despolarizantes provocadas por GABA, em células imaturas, ativam canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e reduzem a atuação de canais de Mg^+ , também dependentes de voltagem, por meio do bloqueio de NMDA, resultando em um influxo de Ca^{2+} (LEINEKUGEL et al. 1997; VAN DEN POL et al., 1998). Este aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} tem um importante papel no desenvolvimento neuronal (LOTURCO et al., 2003; IKEDA et al., 1997; KIRSCH e BETZ, 1998). Na Figura II.6, ilustram-se as mudanças ocorridas nos cotransportadores durante o desenvolvimento de células neuronais.

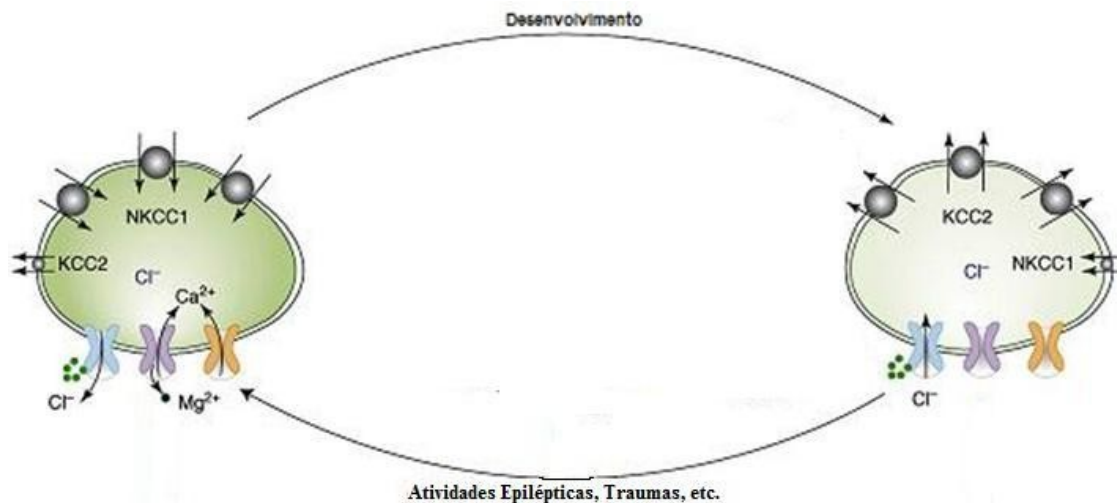


Figura II.6: Modificações na homeostase do cloreto durante o desenvolvimento. Efeitos durante o desenvolvimento, expressão da atividade dos cotransportadores NKCC1 e KCC2 e influências na $[Ca^{2+}]_i$. Na esquerda, uma célula imatura, com alta expressão e função do NKCC1 (em relação ao KCC2), mantém a $[Cl^-]_i$ alta. Quando o GABA se liga aos receptores do tipo GABA_A, um efluxo de Cl^- produz respostas excitatórias que removem o bloqueio de Mg^{2+} , no receptor NMDA, o que, conseqüentemente, permite a entrada de Cátions na célula, por abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Na direita, durante um desenvolvimento normal, o aumento na expressão de KCC2 resulta na redução de $[Cl^-]_i$, que produz uma inibição quando receptores GABA_A são ativados. Depois de AE's ou traumas, o neurônio reverte a homeostase do Cl^- , assemelhando suas respostas àquelas típicas de células imaturas.

Adaptado de: FIUMELLI E WOODIN, 2007.

A hiperpolarização ou inibição por meio de receptores GABA_A dependem, principalmente, da relação entre o E_{Cl^-} e o V_M . Tratando-se de imaturos, onde a $[Cl^-]_i$ é alta, o E_{Cl^-} é mais positivo que V_M , a ativação de GABA_A media correntes despolarizantes de Cl^- (LUHMANN e PRICE, 1991; KAKAZU, 2000; BEN ARI et al., 2004). Por outro lado, em cérebro maturo, onde a $[Cl^-]_i$ é baixa, o E_{Cl^-} é mais negativo que V_M , resultando nos PIPS's (ANDERSEN et al., 1980, BENARD, 2000). Esta situação indica que a $[Cl^-]_i$ não é passivamente distribuída sob a membrana e que sua taxa é regulada pelos cotransportadores e extrusores de Cl^- (PAYNE, STEVENSON E DONALDSON, 2003). Nesse sentido, nota-se a importância destes mecanismos em epilepsia, incentivados pelo aumento na concentração extracelular do íon potássio ($[K^+]_o$) que é típica dos modelos experimentais AE's.

II.5 - MODELO DE HIPERSINCRONIA INDUZIDO POR ALTO POTÁSSIO

A variação da $[K^+]_o$ no meio extracelular em fatias hipocâmpais constitui um modelo agudo de indução de AE's. Esse tipo de tecido contém uma circuitaria e

elementos suficientes para sustentar atividades de crises por um minuto ou mais (JEFFERYS,1995). No modelo de hipersincronia induzido por alto potássio, AE's são produzidas por elevação da concentração extracelular do íon potássio no banho de fatias hipocampais. Sob estas condições juntamente à redução na $[Ca^{2+}]_o$, o giro denteado (GD) do hipocampo (Figura II.7) exhibe AE's espontâneas e prolongadas de grande amplitude (PAN e STRINGER, 1996; XIONG e STRINGER, 2000; CARVALHO, 2003). Na figura II.7, estão esquematizadas as regiões do hipocampo e suas respectivas comunicações.

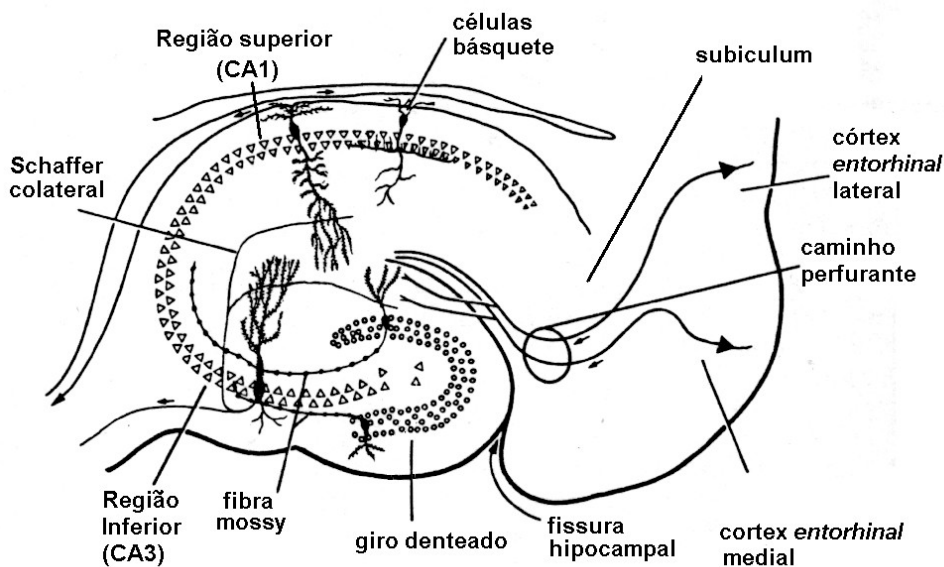


Figura II.7 – Representação esquemática do hipocampo de rato sob um corte transversal. Nele as células granulares são representadas por círculos enquanto os triângulos representam as células piramidais. No *Schaffer* colateral encontram-se as principais ligações entre as regiões CA1 e CA3. As ligações entre as regiões CA3 e o giro denteado são feitas por meio das fibras musgosas. O caminho perfurante, que parte do *cortex entorhinal*, tem ligações diretas com as árvores dendríticas do giro denteado, caracterizando um meio de entrada de sinais no hipocampo e sua comunicação com o restante do cérebro. Modificado de: ENGEL (1989).

As atividades resultantes do aumento da $[K^+]_o$ possuem várias características típicas. Dois tipos de AE's podem ser induzidos quando a variação no nível de potássio ocorre de 3,5 para 8,5 mM, com concentrações de $[Ca^{2+}]_o$ e $[Mg^{2+}]_o$ mantidas em aproximadamente 1,5 mM e menos. O primeiro tipo ocorre quando os chamados bursts interictais, caracterizados por rápidas e breves despolarizações da membrana, coincidentes com bursts de potenciais de ação, iniciam-se na região inferior (CA3 – figura II.8) e se propagam para a região superior do hipocampo (CA1) gerando um outro tipo de atividade

com despolarizações prolongadas e um aumento na frequência dos bursts, conforme a figura a seguir (MCBAIN, 1995):

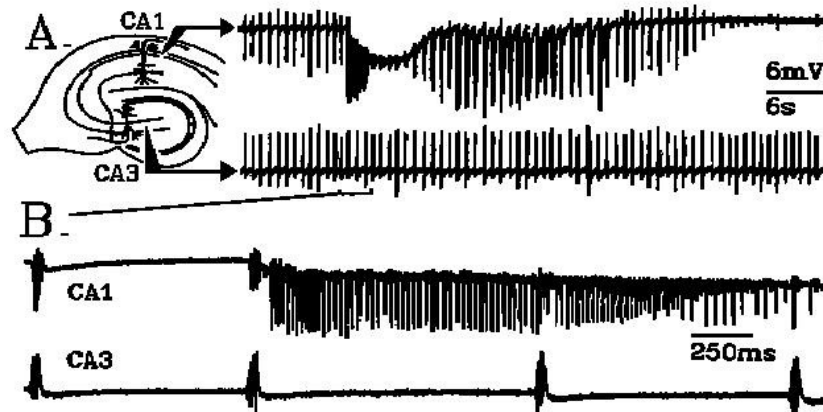


Figura II.8: Crises espontâneas induzidas por alta $[K^+]_o$ nas regiões de CA1 e CA3 de fatias hipocâmpais banhadas com 1,2 mM de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Em A, esquema e registro eletrofisiológico de tais regiões durante crises espontâneas. Uma expansão da escala de um componente da crise foi feita em B, onde se podem diferenciar períodos ictais de interictais. Adaptado de: TRAYNELIS E DINGLEDINE, 1989.

Diante dessas mudanças ocorridas na atividade celular, o modelo do alto potássio permite um estudo da atividade interictal espontânea e crises com um impacto relativamente pequeno e sem a necessidade de estímulos elétricos nos caminhos aferentes. Além disso, este modelo se torna bastante aplicável ao estudo de mecanismos de transição entre os períodos ictais e interictais das atividades no hipocampo (BANKE e MCBAIN, 2006).

Haja vista a influência das alterações sofridas no tecido por meios de alterações nas concentrações de potássio. Com poucas exceções, como a ativação da bomba de Na^+/K^+ e bloqueio da condução axonal, o aumento da $[K^+]_o$ é majoritariamente excitatório. Isso leva a um grande número de investigações e formulação de hipóteses de mecanismos, que envolvem o potássio, contribuintes para a excitabilidade neuronal e geração de crise.

II.5.1 - Alterações no Potencial Reverso do Potássio

Uma hipótese recorrente para o aumento da excitabilidade neuronal configura-se de alterações no potencial de equilíbrio do potássio (MCBAIN et al., 1995). O aumento na $[K^+]_o$ citada no tópico anterior, de 3,5mM para 8,5 mM, pode causar uma mudança

despolarizante no potencial de Nernst para o potássio (E_K) de 23 mV e, conseqüentemente, mudanças na intensidade das correntes de K^+ geram uma variedade de ações excitatórias. Uma variação positiva em E_K despolariza as células piramidais, alterando seu potencial de membrana, e, conseqüentemente, podendo ativar condutâncias dependentes de voltagem (DELPIRE, 2000).

Adicionalmente, outro fator influente no aumento da excitabilidade neuronal são modificações ocorridas no volume extracelular, o que ocorre tanto durante o desenvolvimento neuronal quanto durante a variação de íons nos meios intra e extracelular.

II.5.2 - Redução do Espaço Extracelular

O espaço extracelular (EEC), considerado um importante canal de comunicação entre neurônios e entre os neurônios e as células gliais (RICE e NICHOLSON, 1988), também apresenta um importante papel na excitabilidade neuronal, promovendo alterações na transmissão de informações do tecido nervoso. Assim, outra hipótese que versa o aumento da excitabilidade neuronal concomitante ao aumento de potássio pode ser explanada a partir de sua liberação após os potenciais de ação. Seu excesso seria captado por células gliais que teriam volume intracelular aumentado (McBAIN, TRAYNELIS E DINGLEDINE, 1990), promovendo uma redução do EEC.

TRAYNELIS e DINGLEDINE (1989) mostraram que a sincronização neuronal e as AE's induzidas em fatias do hipocampo, por meio do aumento do $[K^+]_o$, são acompanhadas por uma redução no EEC, promovendo, assim, um aumento da concentração de K^+ em animais adultos. Tal redução, afeta o acúmulo de íons, metabólicos e substâncias neuroativas com o desenvolvimento neuronal (PHILLIPS e NICHOLSON, 1979; RICE e NICHOLSON, 1988). Nesse sentido, segundo REZENDE (2006), um equilíbrio dinâmico é restabelecido, nestas condições, pelos mecanismos de co-transporte de cloreto e potássio (KCC's), para o EEC correspondente, com aumento da $[Cl^-]_i$, resultando na redução do E_{Cl^-} , aumentando o nível de excitabilidade neuronal, induzindo as AE's. Assim, se, de forma mais eficiente, a bomba consegue controlar os níveis de potássio extracelular, então, mais eficientemente serão restabelecidos os gradientes de concentração intracelular desse íon, favorecendo o aumento da concentração de KCl e, portanto, da saída desse composto para o meio extracelular, em função de seu gradiente de concentração.

A restrição EEC, como resultado da atividade neuronal ou de estados patológicos no SNC, tem sido descrita como importante para a transmissão sináptica e para comunicação intercelular.

II.5.3 - Sistema GABAérgico

Uma terceira hipótese para a hiperexcitabilidade é a possibilidade de anomalias nos sinais inibitórios no cérebro epilético. Com base nessa premissa, varias drogas anti epiléticas foram criadas visando a manutenção do sistema GABAérgico (DELPIRE, 2000). Usando preparações com fatias hipocampais, HOCHMAN e colaboradores (1999) demonstraram que descargas epileptiformes induzidas por estimulação tetânica dos colaterais de Schaffer, exposição ao 4-aminopiridine (um bloqueador de canais de K^+), ou bicuculina (um antagonista $GABA_A$), ou remoção de Mg^{2+} foram inibidas por incubação com concentrações milimolares de furosemida. Isso indicou um efeito direto da furosemida sobre os receptores do tipo $GABA_A$, e também a participação de um co-transportador diurético, como o KCC2. A inibição do KCC2, acredita-se, deve resultar em um aumento na $[Cl^-]_i$, reduzindo as respostas inibitórias hiperpolarizantes, promovidas por GABA e, conseqüentemente, aumentando a hiperexcitabilidade. Semelhantemente, uma ação excitatória indireta do aumento da $[K^+]_o$ envolve a inibição pós-sináptica. A elevação da $[K^+]_o$ produz uma despolarização no E_{Cl} levando a um decréscimo na força de correntes de Cl^- mediadas pelos receptores do tipo $GABA_A$ implicando no aumento da $[Cl^-]_i$.

O equilíbrio dinâmico proposto por RESENDE (2006) parece contemplar as três hipóteses acima descritas, se tomarmos o equilíbrio homeostático do cloreto durante as AE's. A diminuição no EEC, conjugada ao aumento da $[K^+]_o$, pode estar intimamente envolvida na geração das AE's, quando um novo equilíbrio para o cloreto e potássio é estabelecido pelo sistema GABAérgico.

II.6 - ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO SINÁPTICAS

Devida a sua relação com o sistema límbico e com todo o SNC, o hipocampo de rato tem sido foco central de estudos de AE's (PEREIRA, 2005; RESENDE, 2006). Conseqüentemente, os mecanismos envolvidos na homeostase do cloreto, desse tipo de tecido, tem sido foco de vários estudos. O acúmulo do cloreto intracelular tem sido relatado como um dos principais íons envolvidos na indução e sustentação das AE's (PAYNE, STEVENSON E DONALDSON, 2003). Dessa forma, existe uma relação de

similaridade nos tecidos imaturos e aqueles acometidos por patofisiologias como epilepsia, visto que nos dois casos constata-se valores elevados na $[Cl^-]_i$.

Modelos utilizando de *Kindling* elétrico evidenciaram a ocorrência de uma redução na expressão de KCC2 (RIVERA et al., 1999). e um aumento na expressão de NKCC1 (OKABE et al., 2002). Baseando-se nessas constatações, JIN, HUGNARD E PRINCE (2005) também sugeriram que a redução na extrusão de cloreto, provocada pela diminuição da expressão de KCC2, aliada ao aumento na entrada de cloreto, provocado pelo aumento da expressão do cotransportador NKCC1, poderia reduzir a força de inibição GABAérgica em neurônios, contribuindo para o aumento da excitabilidade e para epileptogênese. Diferentemente à hipótese de aumento e redução nas expressões dos cotransportadores, DIYKOV et al (2008) evidenciaram a redução no E_{Cl^-} mediada pela ação dos NKCC1, sugerindo não um aumento ou redução na expressão dos cotransportadores, mas, sim, uma maior atividade que estes desempenham na célula, nas diferentes condições iônicas.

Em condições cerebrais patofisiológicas, a aplicação de GABA, ativando receptores GABA_A, gera respostas despolarizantes, mediante o decréscimo na expressão KCC2 e o conseqüente aumento na $[Cl^-]_i$ (KAKAZU et al., 1999; YAMANDA et al., 2004). Concomitantemente, este mesmo estímulo é acompanhado de um aumento no Ca^{2+} intracelular em diferentes regiões do SNC (VAN DEN POL et al., 1998; KAKAZU et al., 1999, YAMANDA et al., 2004). Sob estimulação tetânica, tem-se mostrado que preparações com fatias apresentam uma mudança de inibição para excitação como resultado de um aumento na $[K^+]_o$, que provavelmente contribui para a extrusão do Cl^- (DEFAZIO et al., 2000,; TAIRA, LAMSA E KAILA, 1997).

Tendo em vista a relação íntima do cloreto na geração e manutenção de CE's, vários fármacos têm seus princípios ativos baseados na interação do sistema GABAérgico. Contudo, em se tratando de condições em que estas crises sejam mediadas por redução de Ca^{2+} extracelular, são as interações não sinápticas que governam o sistema. Dessa forma, modelos de crises geradas e sustentadas por mecanismos não sinápticos utilizam solução nutriente com baixa concentração de Ca^{2+} , com o intuito de bloquear as conexões sinápticas. Assim quatro tipos básicos de interações neuronais não sinápticas são considerados: efeito de campo elétrico, *gap-junctions*, flutuações iônicas e acoplamento efáptico (JEFFERYS, 1995; DUDEK, SNOW E TAYLOR, 1986; XIONG e STRINGER, 2000; CARVALHO, 2003).

O acoplamento eletrotônico é mediado pelas *gap-junctions*, canais formados por proteínas denominadas conexinas, que permitem a comunicação direta dos espaços intracelulares de células adjacentes. Já as flutuações iônicas, estas comprometem o funcionamento normal do cérebro, visto que ele depende do equilíbrio extracelular de diversos tipos de íons, como potássio, cálcio, sódio, cloreto e magnésio. Similarmente, o efeito do campo elétrico ocorre quando correntes elétricas produzidas por atividades neuronais mudam a excitabilidade de outros neurônios vizinhos através do campo elétrico gerado pelo conjunto de íons. Conseqüentemente, a corrente gerada por um neurônio é conduzida através do meio extracelular e atinge outros neurônios causando despolarizações em suas membranas. Estas mesmas correntes podem causar um tipo específico de comunicação, a qual denominada interação efáptica, que ocorre entre neurônios vizinhos muito próximos (JEFFERYS, 1995).

Baseando-se no fato de que as AE's podem ocorrer em meios contendo baixo Ca^{2+} (KONNERTH, HEINNEMAN e YAARI, 1986) e que as mesmas podem ser induzidas pelo modelo de alto K^+ , ALMEIDA e colaboradores (2008) fizeram um estudo, por meio de simulações computacionais, da indução e sustentação das atividades epileptiformes não sinápticas (AENS's). Nesse trabalho, corpos celulares e células gliais foram representados e seus principais mecanismos foram acompanhados durante a indução e crise. Os autores propuseram uma hipótese referente aos principais mecanismos para a indução das AENS's e células piramidais do SNC.

Segundo eles, a elevação da $[\text{K}^+]_o$ promoveria um aumento na força de entrada de íons pelo NKCC. Esse aumento no influxo aumentaria a $[\text{Cl}^-]_i$ e, conseqüentemente, a saída pelos KCC's. Nessa situação, o influxo pelos NKCC's seria mais efetivo que os KCC's, promovendo o acúmulo de cloreto intracelular. Este acúmulo seria suficiente para promover uma mudança positiva no E_{Cl^-} , a ponto deste ficar mais positivo que o V_M (Figura II.9). Nesta condição, a entrada de Cl pelos canais equivaleria a uma corrente positiva, induzindo a despolarização neuronal. Mudanças nas concentrações de Na^{2+} , K^+ e Cl^- em relação ao V_M no início e durante uma AE induzida por conexões não sinápticas. Interessantemente, apesar de sua sobreposição ao V_M , o E_{Cl^-} sofre variações durante a AE indicando variações nas condutância de cloreto durante o período ictal.

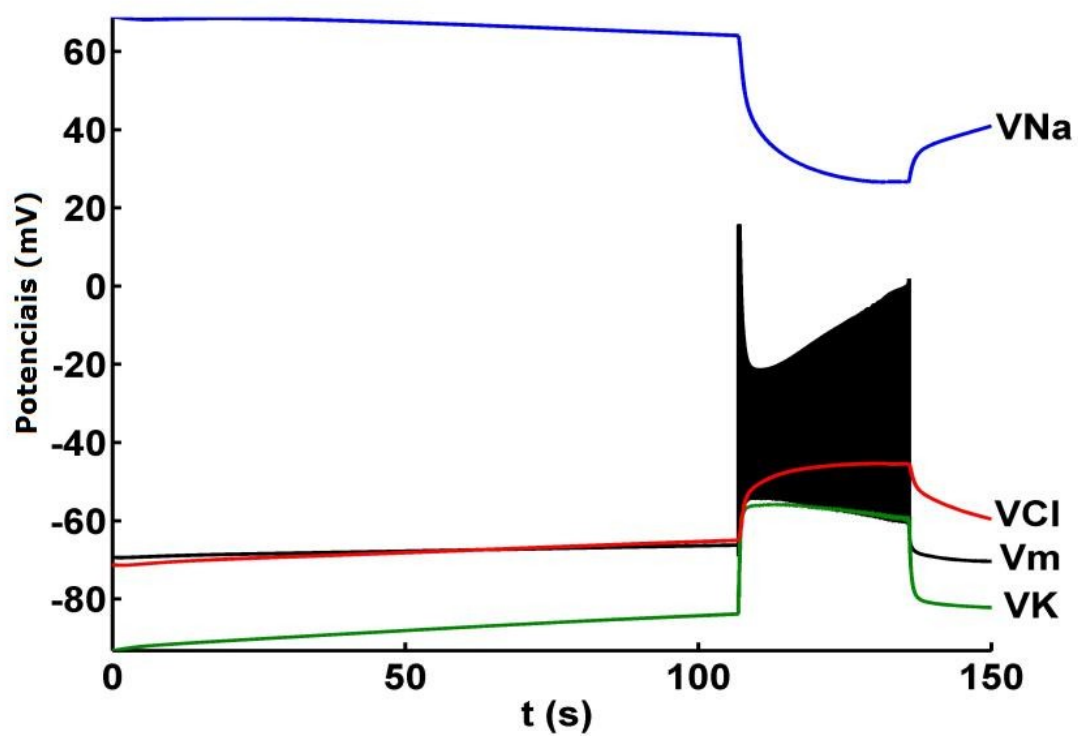


Figura II.9: Variações nos potenciais de Nernst para Na^+ , K^+ e Cl^- e no V_M , em modelo de indução de AE's em hipocampo utilizando alta $[\text{K}^+]_o$ e zero Ca^{2+} . Simulação com o modelo proposto em ALMEIDA et al. (2008).

III. OBJETIVOS

Investigar os mecanismos de homeostase do cloreto e sua relação com a indução de AENS's em tecidos reconstruídos de neurônios de hipocampos de ratos neonatos.

Objetivo específico:

Verificar experimentalmente, por meio da técnica de *patch clamp* na configuração *patch* perfurado com gramicidina, as previsões feitas por simulação computacional por Almeida e colaboradores (2008), de que ao incremento de KCl extracelular corresponde um aumento de Cl⁻ intracelular.

IV. METODOLOGIA

IV.1 - ESCOLHA DE ANIMAIS

O protocolo adotado para a obtenção de cultura dissociada de células do hipocampo de ratos envolveu a utilização de 14 ratas albinas, da linhagem Wistar, com idade gestacional entre 18 e 21 dias, provenientes do Biotério Central da UFSJ. Os animais foram mantidos em cativeiro, com controle diário de luminosidade, em ciclos de 12 horas luz/escuro, temperatura de 25 ± 2 °C e livre acesso a água e ração. O manuseio dos animais no biotério, bem como nos experimentos, foi realizado de acordo com as exigências do Comitê de Bioética e Experimentação com animais, da UFSJ.

IV.2 - DISSECÇÃO DOS FETOS

Resumidamente, as ratas foram sacrificadas por narcose induzida por CO₂. Os embriões foram retirados cirurgicamente dos úteros, decapitados e inseridos em solução de dissecação (Figura IV.1) resfriada com a seguinte composição:

Tabela IV.1: Solução salina de dissecação utilizada durante o procedimento cirúrgico.

Sal	mM
NaCl	137
KCl	5,4
Na ₂ HPO ₄	0,17
KH ₂ PO ₄	0,22
Dextrose	17
HEPES	10

O pH foi ajustado em 7,35 e osmolaridade em 325 mOsm/kg.

Em seguida, os crânios, imersos em solução de dissecação, eram levados para câmara de fluxo laminar vertical, onde se fazia a retirada de seus hipocampos (Figura IV. 1), conforme procedimento a ser descrito a seguir. Placas de 35 mm de diâmetro eram utilizadas para a conservação do tecido em 2,5 mL de solução salina de dissecação resfriada (entre 2 a 4 °C), durante o procedimento. Uma pinça era inserida na altura dos olhos, permitindo a fixação da calota craniana, para remoção do escalpo superior, com auxílio de uma microtesoura e um microscópio (GSZ 2T, GERMANY). Dois cortes laterais e um mediano, realizados sobre calota craniana permitiam sua remoção, realizada

de forma cuidadosa, de modo a evitar danos às meninges. Posteriormente, o cérebro do animal era afastado com uma espátula e depositado em uma nova placa contendo solução de banho. Na Figura IV.1, esse procedimento é esquematizado.

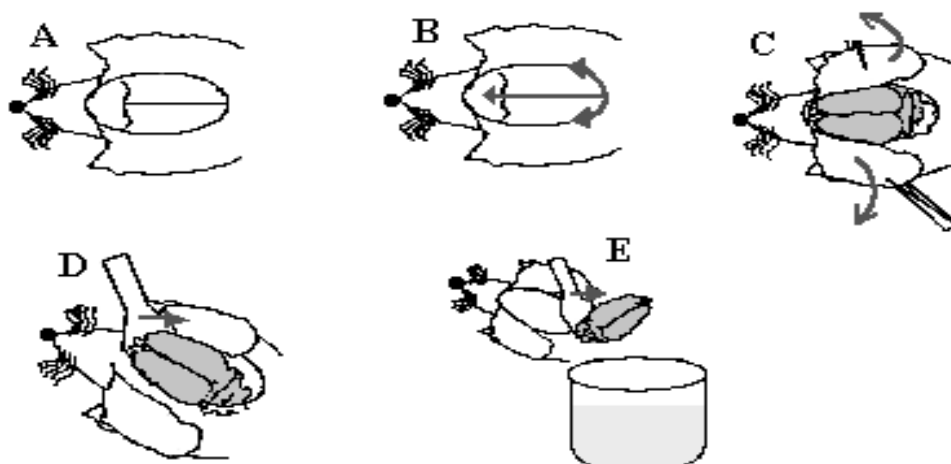


Figura IV.1: Esquema baseado no protocolo para retirada do cérebro da calota craniana. Após anestesia, a calota craniana foi visualizada com auxílio de um bisturi (A), cortes foram feitos no osso occipital com por meio de uma micro-tesoura (B) e seguidos de afastamento das partes submetidas ao corte com um pinça (C). Com auxílio de uma micro-espátula, o cérebro foi removido e inserido em solução resfriada (D e E).

Uma vez nas placas, os cérebros foram posicionados de forma que podiam ser presos por uma pinça na região do bulbo. Um afastamento dos lóbulos com microespátula era feito, até que a parte dorsal dos hipocampus pudessem ser visualizados. Em uma nova placa, as meninges e vasos que envolviam os hipocampus eram retirados e os hipocampus isolados dos lóbulos por meio de cortes com microtesoura.

IV.2.1 - Dissociação dos Hipocampus e Plaqueamento

Após o isolamento, uma média de 16 hipocampus obtidos eram fragmentados, imersos em solução de dissecação acrescida com 0,25% de tripsina (Gibco) e levados a incubadora por 25 minutos, sob temperatura de 37° e atmosfera com 10% de CO₂. Transcorrido esse intervalo, o processo de lavagem do tecido transcorria utilizando-se meio essencial mínimo (MEM), contendo 10% de soro de cavalo e 10% de soro fetal bovino (Tabela IV.2).

Tabela IV.2: Meio Essencial Mínimo – MEM 10/10

Composto	mM
Meio Essencial Mínimo (MEM, Gibco)	80%
Soro fetal bovino (MEM + SB, Gibco)	10%
Desoxirribonuclease (Tipo II, Sigma)	20 µg/mL
Soro de cavalo (MEM + SW, Gibco)	10%

Durante o último banho do tecido em MEM, pressões positivas e negativas eram aplicadas no interior da pipeta (do tipo Pateur) repetidas vezes, para a dissociação mecânica do tecido. O produto final constava de uma solução visivelmente homogênea, a ser aliqüotada em placas estéreis. O preparo dessas placas era obtido por meio de iluminação ultravioleta “*over night*” e cobertas com solução de 40 µg/mL de hidrobrometo de poli-L-lisina (Sigma), cujo excesso era retirado após 24 h.

IV.2.2 - Armazenamento e Manutenção das Culturas

Ao término de cada dissociação, os meios de cultura permaneciam na estufa em condições apropriadas de atmosfera e temperatura. Após 24 h, 75% do meio de cultura era substituído por um meio similar ao MEM 10/10, destituído de desoxirribonuclease (DNase) e soro fetal bovino, o MEM 10. No sexto dia, ao meio de cultura eram adicionados 100 µL de solução contendo MEM 10, uridina (1 mg/mL) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina (2 mg/mL), afim de inibir a proliferação de células não-neuronais.

O MEM 10 era mantido por sete dias, quando era parcialmente (50%) renovado. Esta troca era repetida em intervalos de três dias, a contar do sétimo, até que pudessem ser levadas ao *setup* para eletrofisiologia, que ocorria entre o 15º e 21º dia.

IV.3 - SETUP

Basicamente, o *setup* montado exclusivamente para as medidas realizadas nesta dissertação segue os moldes dos empregados pelos criadores da técnica Sakmann e Neher (para revisão: HAMILL et al., 1981).



Figura IV.2: *Setup* proposto para aplicação da técnica de *patch clamp*. Na parte esquerda da figura pode ser notado o sistema de geração, aquisição e análise de sinais e, fontes de alimentação de todos os sistemas envolvidos enquanto à direita, inseridos em uma gaiola de Faraday, encontra-se o sistema de controle, aquisição de imagens e soluções empregadas nas culturas.

À esquerda da Figura IV.2, pode-se identificar um microcomputador, utilizado para controle de estímulos, aquisição e gerenciamento de sinais, por meio do software pClamp 6.0. Os sinais, amplificados com um amplificador PC 501A (Warner Instruments), eram digitalizados utilizando-se uma placa conversora AD-DA (Digidata 1200). No lado esquerdo da figura IV.3, pode-se evidenciar a presença da bancada experimental. Um microscópio Nikon (modelo FN 01) era responsável pela visualização das células e monitoração da aproximação da pipeta e do tubo em U. Essa aproximação era promovida por micromanipuladores fixos a uma mesa auxiliar, como pode ser visto na Figura IV.3. Na mesma figura, podem-se visualizar o sistema de micromanipulação. À direita, o arranjo (MARISHIGE/JAPÃO) para o tubo em U e, à esquerda, o arranjo (MARISHIGE/JAPÃO – modelo MC 35A e MARISHIGE/JAPÃO modelo MHW-3) para a aproximação da micropipeta.

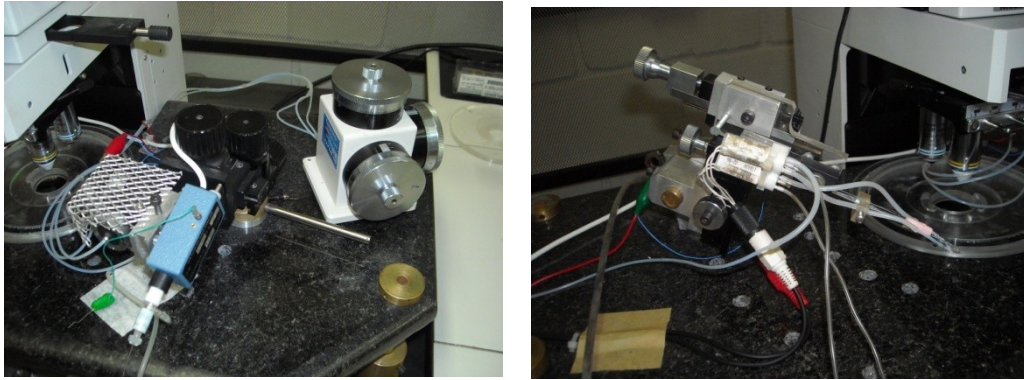
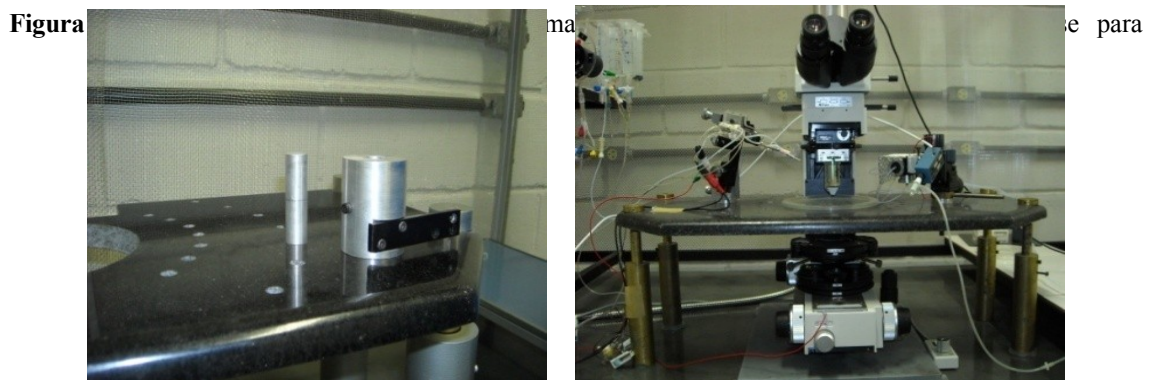


Figura IV.3 – Sistemas de aproximação de eletrodos de gravação (esquerda) e de tubo em U (direita). A pipeta contida do eletrodo de gravação são fixadas a um Holder que, por sua vez, faz contatos com um pré-amplificador. A movimentação do conjunto é feita por meio de um manipulador milimétrico e outro micrométrico (hidráulico). O tubo em U é alimentado por duas válvulas solenóides quais são responsáveis pela aplicação de pulsos de drogas no entorno das células investigadas.

O sistema de tubo em U também era controlado pelo software pClamp 6.0. para a injeção de solução contendo GABA nas proximidades das células de trabalho, estimulando assim, a abertura de canais de cloreto. Foi construída uma interface de comunicação e uma fonte para alimentação de válvulas solenóides, como mostrado na figura IV.4, à esquerda.(ALBUQUERQUE *et al.*, 1991). O tubo foi confeccionado a partir de um capilar de vidro (diâmetro externo de 0,4 mm, World Precision Instruments) dobrado em forma de U, sob calor produzido por uma microforge e, contendo um orifício de cerca de 250 μm de diâmetro, na região externa dianteira do tubo.

A mesa auxiliar para a fixação dos micromanipuladores foi construída de forma a permitir ajustes na altura e liberdade de fixação dos micromanipuladores. Optou-se por bases em bronze para maior sustentabilidade e melhor fixação do arranjo, além disso, tais bases eram fixas na mesa principal por meio de anéis construído em acrílico e fixo entre as peças.



A mesa auxiliar ainda contava com um furo central, destinado à fixação de um disco, construídos um disco em acrílico, conforme ilustrado na Figura IV.5 para acomodar as placas de cultura. No disco, eram fixados também capilares (Borosilicato - World Precision Instruments – 1,5mm) curvos, ligados a tubos de silicone, que tinham como objetivo a troca dos meios de cultura.

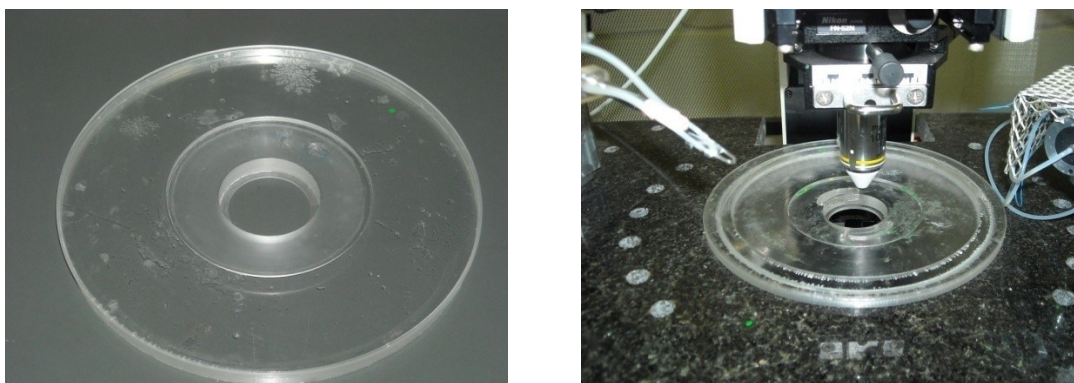


Figura IV.5: Disco para acomodação das placas de cultura.

Dois tipos de depósitos de soluções eram utilizados: para grande e pequeno volume. Um suporte para 10 seringas (20 mL) foi construído e fixado na parte superior esquerda ao microscópio. O controle da saída de soluções de determinada seringa era escolhido via válvula seletora, conforme foto da figura IV.6. O balão (200 mL), que também pode ser visualizado na mesma figura, era utilizado como sistema à parte para banho com bloqueadores durante o registro de sinais.

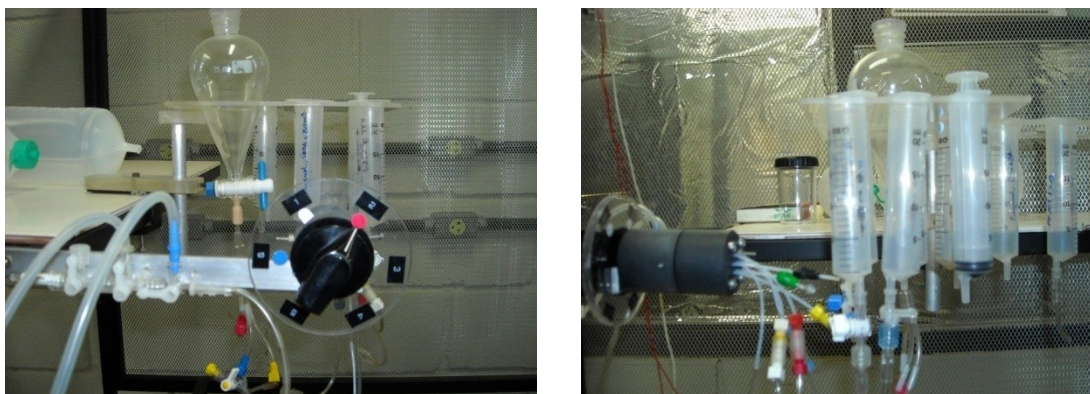


Figura IV.6: Sistema de injeção de soluções de pequeno volume. A escolha das soluções para banho determinada célula era promovida por meio da válvula seletora.

Recipientes (frascos de soro fisiológico) de maior volume (1 L) foram adaptados no alto esquerdo do setup, com o intuito de armazenar soluções de banho, sem adição de bloqueadores, destinadas à reposição dos nutrientes extracelulares. Esses recipientes, bem como os demais, eram inseridos dentro da gaiola de Faraday, visando minimização de ruídos. A gaiola foi construída nas dimensões 2x1x1,3m, com metalon (2x3cm) e recoberta por tela, também em aço, de (3x5mm de malha).

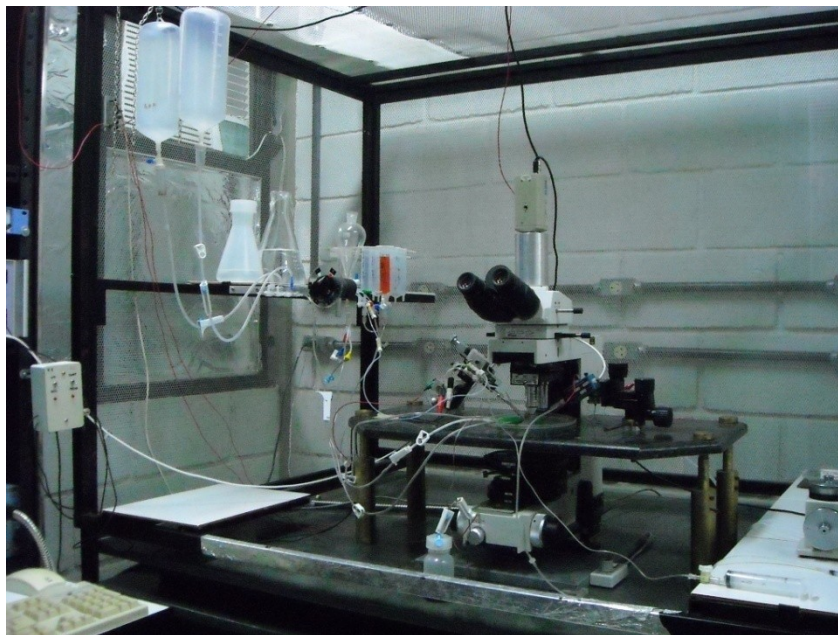


Figura IV.7: Sistema de injeção de soluções de grande volume utilizado como depósito de solução para o banho das culturas.

IV.3.1 - Controle Óptico e Microscópico

Um microscópio Nikon modelo ECLIPSE FN1 era utilizado para a visualização das células mediante um aumento promovido por objetivas de 10 e 40x. Este microscópio foi escolhido dada a sua aplicabilidade em protocolos de *patch clamp*, tanto com culturas dissociadas, quanto fatias de tecido.

A visualização das células era realizada por meio de uma câmera de CCD (NITRIX N700A) que remetia a um televisor (E13320- THONSON MULTIMEDIA 14'),

possibilitando a visualização e manuseio da micropipeta, nas proximidades da célula investigada.

As placas de cultura eram posicionadas no centro do setup. Em seguida, tubos eram fixados próximos às bordas das placas para que se fizesse o fluxo das soluções de banho. O excesso era controlado por meio de um sistema de sucção, constituído por uma bomba para aquário do tipo *hobby*.

IV.3.2 - Injeção de Drogas

A solução contendo GABA e TTX (ou Eugenol) era armazenada em uma seringa (20 mL), na região mais alta do *setup*, para que pudesse se deslocar por gravidade até o tubo U e dele, pela outra extremidade do U, para um recipiente externo de descarte, conduzido pela pressão negativa induzida pela diferença de altura entre o tubo e o ponto de descarte.

A parte curva do tubo U, onde se abre um orifício, era posicionada, por meio de um micromanipulador, a uma distância de, aproximadamente, 150 a 250 μm da célula. O estímulo era aplicado bloqueando a saída por gravidade da segunda extremidade do tubo U, por meio de uma válvula solenóide, com tempo de fechamento ajustado de modo a promover uma saída de fluido pelo orifício e banhar toda a célula com GABA.

IV.3.3 - Fabricação de Micropipetas

As micropipetas eram construídas a partir de capilares de vidro de borossilicato, com diâmetro externo de 1,5 mm (World Precision Instruments - USA), com filamento interno, puxadas com um puxador de pipetas DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Germany) (Figura IV.8), programado para quatro etapas, sendo a última para flambagem das bordas da micropipeta, garantindo melhor selamento com a superfície da membrana celular. Os parâmetros de estiramento do puxador de pipetas eram ajustados de forma a obter pipetas com resistência final entre 5 e 9 $\text{M}\Omega$, quando preenchidas com SIP e inseridas na solução de banho.



Figura IV.8- Puxador de pipetas horizontal (DMZ – Zeitz Instruments, Germany). Modelo empregado na fabricação de pipetas utilizadas em nossos experimentos.

IV.3.4 - Amplificadores

Depois de pré-amplificado pela *headstage*, os sinais passavam ao um segundo estágio de amplificação, com o amplificador PC-501 (Warner), utilizando um filtro de 4 pólos, a uma frequência 2KHz passa-baixa. Após amplificação e filtragem, o sinal era digitalizado como sistema Digidata 1200 a uma amostragem de 8192 KHz, e exibido, em tempo real por meio do *software* Clampex 6.0 (Suíte pClamp – Axon Instruments).

IV.3.5 - Soluções Aplicadas na Eletrofisiologia

IV.3.5.1 - Solução de Micropipeta

A solução utilizada para o preenchimento das pipetas (SIP – Solução Interna de Pipeta) baseou-se no trabalho de JIN e colaboradores (2005).

Tabela IV.3 – Solução Interna Padrão (SIP)

Composto	mM
CsCl (Sigma)	130
EGTA (Sigma)	5
CaCl ₂ .2H ₂ O (Sigma)	0,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	2
Hepes (Sigma)	10

pH=7,3 ajustado com Solução de CsOH a 0,56 M

Um estoque constituído de 50 frascos, contendo 1mL de solução era mantido a uma temperatura de -10 °C. Para cada experimento, um novo frasco era aberto, em intervalos de tempo de 2 horas, e a solução dividida em duas partes, sendo uma destinada a adição de Gramicidina. A outra parte era usada para preenchimento da ponta da micropipeta, o que, segundo AKAIKE (1996), auxilia na formação do selo, evitando a ação imediata do antibiótico sobre a membrana.

A gramicidina (Sigma) era dissolvida em DMSO (Sigma) e mantida em estoque à concentração de 10 mg/mL e quando adicionada à SIP, no início de cada experimento, assumia uma concentração de 75 -100 µg/mL.

IV.3.5.2 - Soluções de Banho e Estímulo

Durante todo o tempo de preparação, aproximação da pipeta, formação do selo e reação da Gramicidina, a cultura era banhada com Solução Externa Padrão (SEP) que consistia dos seguintes sais:

Tabela IV.4: Solução Externa Padrão – SEP

Composto	mM
NaCl (Sigma)	165
KCl (Sigma)	5
Hepes (Sigma)	5
Glicose (Sigma)	10
CaCl ₂ (Sigma)	2

pH = 7,35 ajustado com NaOH (1M) e osmolaridade = 335 mOsmol/L

A SEP permitia o equilíbrio das concentrações iônicas intracelulares dentro dos níveis de repouso, bem como auxiliava na formação dos giga selos – Selos com resistência maior que 1 G Ω (JIN, HUGUENARD e PRINCE, 2005). Visando estudar a variação do potencial de Nernst de cloreto, na ausência da ação de conexões sinápticas, e sob a ação do incremento da concentração de potássio extracelular, eram adotadas soluções com Ca²⁺ reduzido (JEFFERS e HAAS, 1982; TAYLOR e DUDEK, 1982) e o potássio extracelular que era incrementado para uma concentração de 8,5 mM ou reduzido a 3 mM (Tabela IV.5) . O aumento baseia-se no fato de que nestas condições as células hipocâmpais são hábeis para gerar atividades epileptiformes não sinápticas (SOMJEN et al., 1985). Os aumentos e trocas dos sais foram baseados no trabalho de VAN BREDERODE, TAKIGAWA E ALZHEIMER, (2001) que, em trabalho similar, compararam os mecanismos que controlam a homeostase do cloreto em compartimentos de dendritos e somatos por meio de correntes de natureza GABAérgica.

Tabela IV.5: Soluções para protocolo com cultura

Composto	K ⁺ reduzida	Alto K ⁺
	mM	mM
NaCl (Sigma)	150	145
KCl (Sigma)	3	8,5
MgCl ₂ .6H ₂ O (Sigma)	5	5
Hepes (Sigma)	1	1
EGTA (Sigma)	0,2	0,2

pH = 7.3 ajustado com NaOH (1 M) e osmolaridade = 380 mOsmol

A troca de soluções era realizada a uma taxa de 2 mL.min⁻¹. Isso possibilitava a substituição total de soluções de banho em tempo hábil para registros das manobras experimentais sem comprometer o selamento do *patch-clamp (cell attached)* e sem danos às células da cultura.

IV.3.5.3 - Protocolos de Aplicação de Soluções

Os experimentos procederam buscando conservar as mesmas condições tanto para grupo controle quanto para o grupo tratado. Cada cultura era submetida a dois protocolos experimentais. Uma primeira placa era utilizada para o protocolo controle. A cultura era submetida à perfusão de SEP até a formação do selo e posterior decréscimo em sua resistência até aproximadamente 200 M Ω , quando o fluxo era trocado pela solução com

K⁺ reduzida (3 mM) acrescida de 200 μM de Eugenol (Sigma), para o bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem.

Quando a resistência estabilizasse em 80 MΩ, um primeiro estímulo, rampa de variação de voltagem, era feito sem que houvesse presença do tubo em U. A resposta era coletada e armazenada. Em seguida, o tubo em U era aproximado da célula e um segundo estímulo era gerado com a presença de pulsos de solução contendo K⁺ reduzida, 50μM de GABA (Sigma) e 200 μM de Eugenol.

Em um segundo momento, outra placa da mesma cultura era utilizada para um protocolo similar com exceção da troca da solução com K⁺ normal por aquela contendo alto potássio (8,5 mM).

IV.3.6 – Clampeamento de Voltagem

Após a formação do selo, o potencial de membrana era fixado em -60 mV até que a resistência de entrada alcançasse 80 MΩ. Posteriormente, ele era chaveado para -100 mV, por um período de 50ms, após o qual era executada uma rampa com excursão de -100 e 10 mV com variações de 10 mV, ao longo de 600ms. O efeito entre variações crescentes (-100 para 10 mV) e decrescentes (10 para -100 mV) foi estudado a fim de se indicar o melhor protocolo de excursão.

Para determinação do tempo ideal de aplicação do GABA, ao longo do qual a rampa era aplicada, foram testados pulsos de GABA com intervalos de tempo variando entre 20 a 600ms. Esses testes determinaram o tempo de excursão da rampa de clampeamento (Figura IV.9).

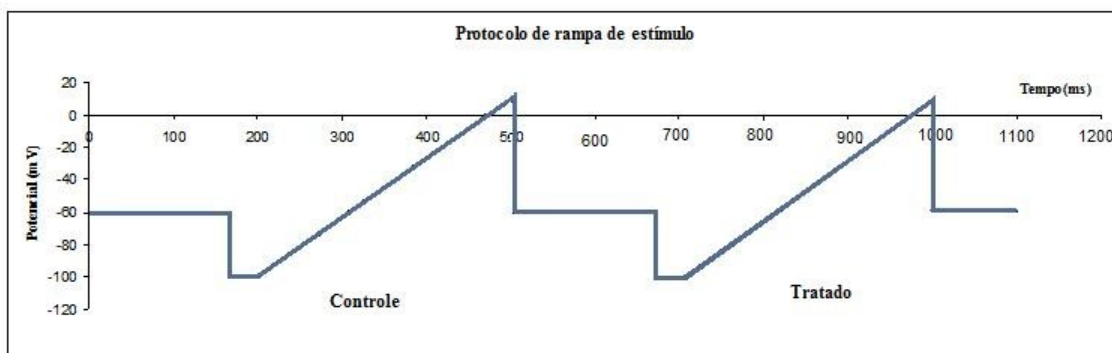


Figura IV.9 – Protocolo de estímulo de rampa para variação de potencial de membrana. Duas rampas de variação de potencial eram aplicadas, sendo uma na presença (Tratado) e outra na ausência (Controle) de GABA na superfície membranar.

IV.3.6.1 - Potencial de Nernst para o Cloreto

O *patch* perfurado com Gramicidina era realizado somente para resistência de membrana próxima de $80M\Omega$ (VAN BREDERODE, TAKIGAWA E OKABE, 2001), nessas circunstâncias, a capacitância da membrana variava entre 10 e 25 pF. O tempo necessário para a ação da gramicidina variou entre 15 e 30 minutos e a temperatura entre 25 e 30 °C.

Cada célula era submetida a três clampeamentos, sucessivos, de potencial com rampa, para posterior cálculo da média. Após esses registros, eram medidos os potenciais de repouso das células, com a corrente fixada em zero. Para verificação da formação do *patch* perfurado, o potencial de repouso era novamente medido, após aplicação de pressão negativa na parte interna da micropipeta, a fim de romper a membrana da ponta da micropipeta e formação de *whole cell*. A diferença na medida do potencial de repouso, em razão da miscigenação da SIP contida na micropipeta com o citoplasma, era a confirmação da formação do *patch* perfurado.

Os registros de correntes correspondentes ao clampeamento do potencial em rampa eram realizados com e sem a presença de GABA. A partir desses registros, o potencial de Nernst para o cloreto era estimado pelo ponto de intersecção entre as curvas na presença e ausência do ácido, conforme descrito por JIN e colaboradores (2005).

Os dados finais utilizados na análise estatística obedeceram alguns critérios básicos (seção IV.4.1) a fim de garantir que tal análise contemplasse somente aqueles dados de potenciais de Nernst referentes à configuração de *patch* perfurado com gramicidina.

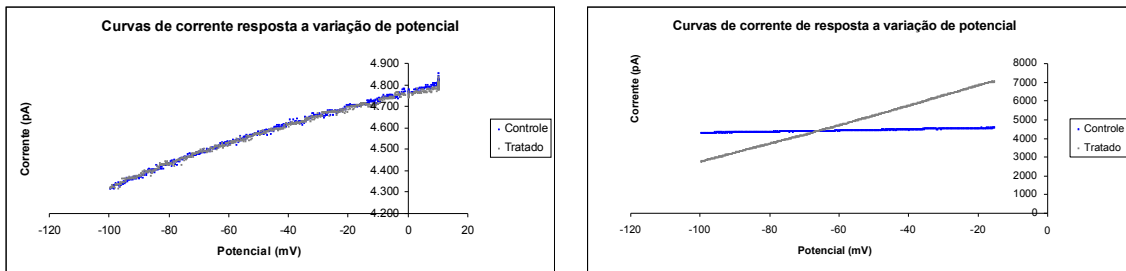
IV.4 - TRATAMENTO DE DADOS

Os potenciais de Nernst eram processados utilizando-se o Clampfit (parte integrante do pacote de sistema de programas pCLAMP 6, da Axon Instruments Inc). Posteriormente, processados e analisados utilizando-se os softwares Splus 6.0, Matlab 7.1 e EXCEL.

IV.4.1 – Critérios de Escolha dos Potenciais de Nernst

As placas de cultura nos dias dos experimentos tinham em média 701 (\pm 154) células por cm^2 . Desta média, dados de 8 a 10 células eram tomados, uma vez que cada placa era submetida à eletrofisiologia por cerca de 2 horas. Assim, foram escolhidos dados de células tratadas com alto potássio (8,5 mM) e dados para células tratadas com potássio normal (3,0 mM). Essa escolha baseou-se em três critérios básicos: i) Valores de potencial de membrana eram considerados verídicos quando se aproximavam daqueles encontrados por pesquisadores que adotaram protocolo similar (BALENA et al., 2008; DIYKOV E HOFFIMAN, 2008). Este critério se justifica pela presença de medidas de potenciais de membrana de células não piramidais, uma vez que apenas o crescimento glial da cultura foi inibido por meio de FDU; ii) Diferença entre os potenciais de membrana na configurações de *patch* perfurado com gramicidina e *whole cell*. Após a coleta de dados para a obtenção do potencial de Nernst, aplicava-se uma pressão negativa, promovendo a configuração *whole cell*, e novamente o potencial de membrana era medido; iii) Diferenças extremas entre os coeficientes angulares das retas ou ausência de diferença. Após a interpolação das curvas de corrente de respostas ao controle e tratamento com GABA, os coeficientes angulares das curvas foram tomados. Baseando em dados de curvas feitas na configuração *whole cell* (aqui suprimidos), todas as diferenças angulares ($\Delta\alpha = \alpha_{\text{tratado}} - \alpha_{\text{controle}}$) ocorridas na configuração de *patch* perfurado que eram estatisticamente inferiores aquelas ocorridas na configuração *whole cell* foram adotadas como resultado. Similarmente, quando $\Delta\alpha$ se aproximava de zero, os dados foram descartados.

A figura IV esboça exemplos de interpolação de curvas para a obtenção dos potenciais de Nernst. Após a formação dos poros ($R < 80\text{M}\Omega$), existem casos em que tal cruzamento ocorria durante toda a excursão da curva (Figura IV.10 (a)). Nesse caso, $\Delta\alpha$ se aproximava de zero. Entendemos que esse valor de $\Delta\alpha$ seja resultante de medições em momentos nos quais a solução contendo GABA não atingia a membrana celular. Diferentemente, nos momentos em que a solução banhava a célula e, esta tinha sua configuração de *patch* perfurado para *whole cel*, $\Delta\alpha$ alcançava valores estatisticamente diferentes (Figura IV.10 (b)). Para confirmação deste ultimo caso, experimentos com a configuração *whole cell* foram executados.



(a) (b)
Figura IV.10: Curvas IxV de células neuronais na presença e ausência de GABA. Em (a) curvas com diferença entre os coeficientes angulares próxima a zero ($\Delta\alpha \approx 0$), enquanto $\Delta\alpha$'s típicos da configuração *whole cell* são mostradas em (b).

IV.4.2 – Análise estatística

Para uma análise dos dados foi construído um diagrama de caixas – o *box plot* (figura V.5). Esse gráfico apresenta os valores centrais dos dados relativos às suas amplitudes. O retângulo no *box plot* representa 50% dos valores centrais (de 25 a 75% dos valores), sendo compreendido por um traço representante daqueles valores de 50% dos dados. O valor representado por asterisco indica uma observação atípica chamada *outlier*.

Para a averiguação de possíveis igualdades entre os E_{Cl^-} 's e V_M 's nas diferentes $[K^+]_o$, foi utilizado o teste de hipóteses t-student para amostras pareadas e com diferentes repetições com nível de significância de 5%. Como tais procedimentos partem da premissa de normalidade, procedeu-se também a uma verificação de desnormalidade dos resíduos.

V. RESULTADOS

Foram realizados 27 experimentos, com cultura de idade média de 18 dias. Desses experimentos, 4 se destinaram ao ajuste de tempo para rampa de estímulo e pulsos de solução contendo GABA. Os demais 23 experimentos foram empregados as medidas das correntes de resposta ao clampeamento em rampa do potencial de membrana, na presença e ausência de GABA, para as duas concentrações diferentes $[K^+]_o$ (3,0 e 8,5 mM). Foram utilizadas um total de 117 células piramidais, sendo 44 destinadas ao protocolo com $[K^+]_o=3$ mM e 73 à $[K^+]_o=8,5$ mM (Tabela V.I).

Tabela V.1 – Relação de células submetidas ao protocolo experimental de alteração da concentração de potássio extracelular, para avaliação do efeito sobre o E_{Cl} , utilizando patch-clamp perfurado.

$[K^+]_o$	Nº de células
3,0 mM	44
8,5 mM	73

V.1 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE APLICAÇÃO DE GABA

O intervalo de tempo para aplicação da rampa foi estimado estudando-se o efeito da aplicação sobre a corrente registrada. Foram registradas correntes em resposta à aplicação de GABA, em intervalos de tempo entre 20 a 600 milissegundos (20, 50, 100, 150, 250 e 600 ms). O estudo possibilitou avaliar que aplicações de GABA com tempo acima de 600 geram uma máxima ativação de canais de forma que a corrente de resposta constante tempo suficiente para a aplicação do estímulo de rampa. A amplitude máxima dessa resposta foi obtida quando pulsos de GABA eram aplicados com tempo mínimo de 50 ms. Isso, portanto, permitiu definir o instante (após 50 ms da aplicação de GABA) e tempo de aplicação da rampa de clampeamento (600ms) (Figura V.1).

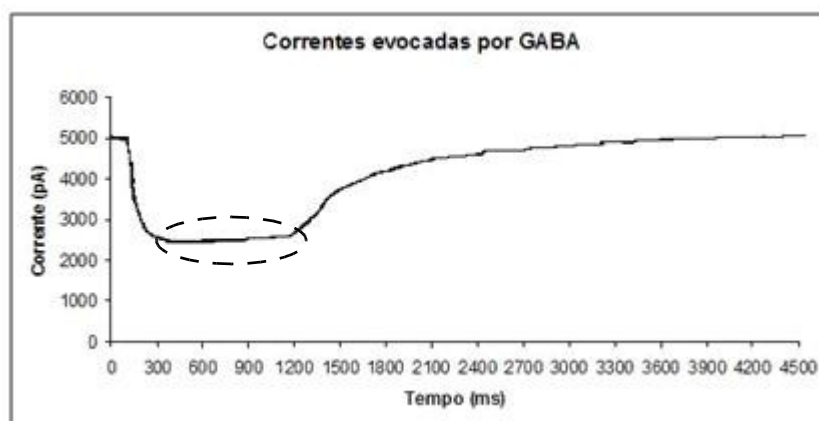


Figura V.1: Curva de corrente evocada em neurônio hipocampal exposto a GABA por 600 ms. A região circunscrita indica o intervalo onde a variação de voltagem foi aplicada.

V.2 - EFEITO DAS DIFERENTES $[K^+]_o$ SOBRE V_M E E_{Cl^-}

As médias de V_M e E_{Cl^-} retiradas de 9 experimentos, correspondentes a alto potássio extracelular, bem como as médias de 5 experimentos, correspondentes a 3mM de potássio extracelular, foram determinadas. Para tanto, as correntes em resposta ao clampeamento em rampa do potencial, com e sem a aplicação de GABA, foram interpoladas. A partir das curvas de corrente referentes à diferença para os casos com e sem a aplicação de GABA determinaram-se os potenciais de Nernst de cloreto. Os potenciais de repouso foram mensurados no momento antecedente ao protocolo de rampa, fazendo-se a leitura do potencial com o amplificador no modo *current clamp*.

Os potenciais de membrana e de Nernst obtidos em cada uma das condições experimentais são apresentadas na Tabela V.2. A diferença no número de amostras entre as duas concentrações avaliadas se deve à dificuldade no protocolo experimental no que se diz respeito à ausência de cálcio no meio externo, simultâneo a alta concentração de potássio, comprometendo a estabilidade do selo por tempo prolongado.

Tabela V.2 - Valores das estatísticas descritivas para os potenciais de membrana (V_M) e de Nernst (E_{Cl}) para concentração normal e alta de potássio.

$[K^+]_o$	Potencial	Média (mV)	Desvio padrão
3 mM	E_{Cl}	-57,47	5,95
	V_M	-69,11	1,85
8,5 mM	E_{Cl}	-64,16	2,15
	V_M	-69,88	2,54

Para verificar a tendência central e de dispersão entre os potenciais obtidos, foi construído um diagrama de caixas (Figura V.2), bem como a tabela de valores médios, erro padrão da média e desvio padrão.

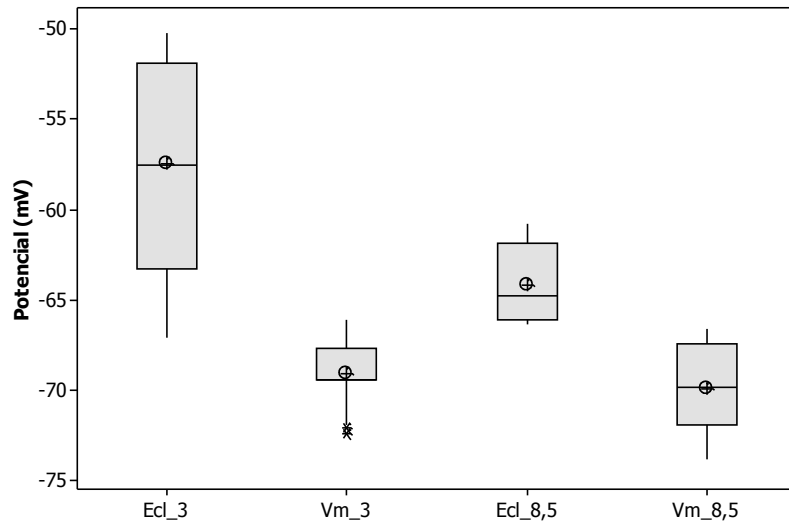


Figura V.2 - Diagrama de caixas para o percentual de peixe sobrevivente para o tratamento com concentração de 3 mg/L.

Para garantir a adequação da análise com o teste de normalidade dos resíduos, a distribuição normal dos resíduos foi confirmada (Figura V.3).

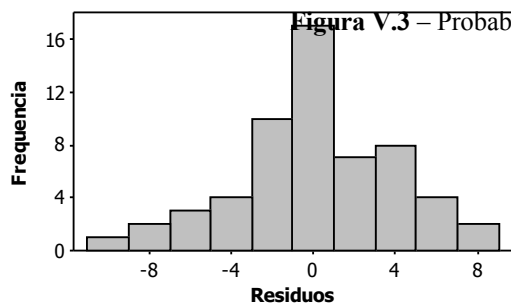
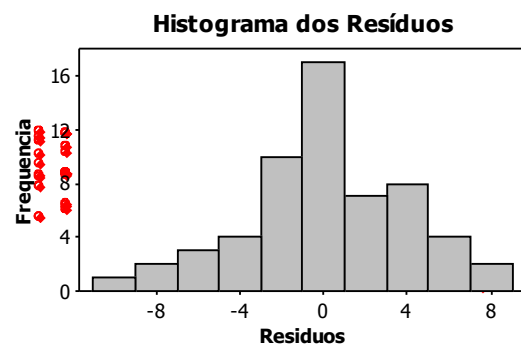
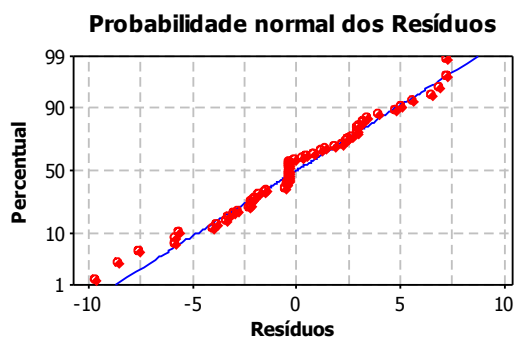
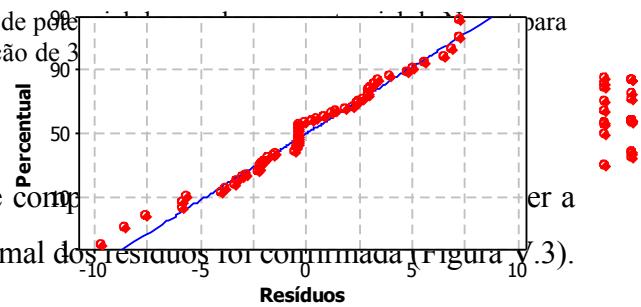


Figura V.3 – Probabilidade Normal dos Resíduos.

Pelos gráficos de probabilidade e histograma apresentados verifica-se que há validação da pressuposição de normalidade dos dados. Assim, o teste de hipótese foi aplicado aos dados para a averiguação de possíveis igualdades entre os E_{Cl} 's e V_M 's nas diferentes $[K^+]_o$.

Através do teste t-student pode-se evidenciar uma diferença significativa entre o E_{Cl} e V_M para a $[K^+]_o = 3$ mM (P-valor = 0002) e, portanto, pode-se afirmar, a um nível de significância de 95%, que o E_{Cl} é despolarizado em relação ao V_M nessa concentração. Similarmente, comparando o E_{Cl} e V_M para a $[K^+]_o = 8,5$ mM, como o P-valor ($P \approx 0,036$) foi inferior ao valor nominal ($P \approx 0,05$), a hipótese de que E_{Cl} e V_M sejam iguais deve ser rejeitada. Portanto, pode-se afirmar que o E_{Cl} é despolarizado em relação ao V_M para $[K^+]_o = 8,5$ mM, sendo $\alpha = 0,05$.

Para análise dos V_M 's, a sobreposição dos intervalos de confiança indicou igualdade entre os tratamentos. De uma forma sucinta podemos inferir, ao grau de confiança de 95%, que os potenciais de membrana utilizados provenientes de ambos os tratamentos são iguais enquanto os E_{Cl} 's desses tratamentos se diferem como também diferem dos seus respectivos V_M 's.

V.3 – SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Com o intuito de interpretar os resultados experimentais, foram realizadas simulações computacionais utilizando o modelo matemático de AENS's, desenvolvido por Almeida e colaboradores (2008). Brevemente, o modelo consiste de uma rede tridimensional de unidades funcionais, sendo cada unidade composta de um par neurônio-glia e um compartimento extracelular (Figura V.4).

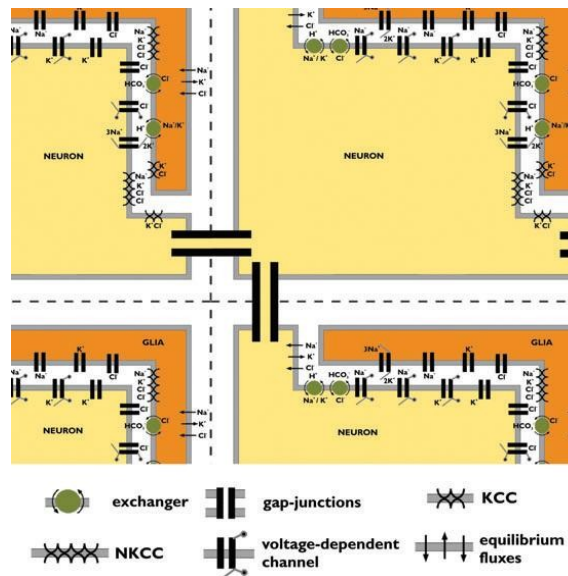


Figura V.4 – Representação esquemática de uma rede de unidades funcionais, estrutura básica do modelo. Cada unidade funcional é composta de um par neurônio-glia e um compartimento extracelular. Cada neurônio e cada glia são representados eletroquimicamente, sendo constituídos por trocadores, *gap-junctions*, cotransportadores, canais iônicos, fluxos de equilíbrio e bombas de sódio/potássio. (Extraído de ALMEIDA et al., 2008)

Para representar uma célula neuronal isolada em cultura, a simulação foi realizada considerando-se uma única unidade funcional, contendo um neurônio, sem glia e com volume extracelular infinito. Em função dos potenciais registrados, algumas considerações podem ser feitas, de tal modo a permitir uma reconstrução computacional das condições experimentais das células em cultura.

O fato dos potenciais de repouso medidos terem exibido uma indiferença à alteração da concentração de KCl extracelular deve implicar em redução da permeabilidade de membrana a potássio. Por outro lado, nada se pode afirmar quanto à permeabilidade dos canais de cloreto, considerando-se que a alteração do gradiente transmembrânico de cloreto em função do incremento de KCl, corresponde a 5,5 mM, em 170 mM, sendo, portanto, da ordem de apenas 3%. Isso permite assumir que a variação do potencial de Nernst de cloreto esteve dentro da faixa de desvio experimental. Por outro lado, considerando-se o efeito do incremento de KCl extracelular sobre os mecanismos cotransportadores, pode-se assumir que o influxo de cloreto pelo NKCC é favorecido pelo incremento de KCl e que o efluxo de cloreto pelo KCC é decrementado. Isso, por sua vez, indica que deveria ser observada uma alteração do potencial de Nernst de cloreto no sentido de uma positividade em função do incremento de cloreto intracelular. Contudo, os resultados experimentais mostraram uma situação diferente da esperada. Os registros identificam uma redução do potencial de Nernst de cloreto em correspondência ao incremento de KCl extracelular. Para tanto, uma única situação poderia justificar tal

achado: uma redução da concentração intracelular de cloreto. Esse decremento de cloreto intracelular só se justificaria pensando em uma redução da afinidade extracelular dos cotransportadores ao KCl.

Partindo dessas premissas, as simulações computacionais foram realizadas considerando-se uma redução da permeabilidade dos canais de potássio e uma redução da afinidade extracelular dos cotransportadores. Primeiramente, para reduzir a dependência do potencial transmembrânico em relação às alterações da concentração extracelular de K^+ , sua permeabilidade foi diminuída para 10 % do seu valor normal. Adicionalmente, o NKCC foi suprimido da simulação e a afinidade do KCC para os íons na face extracelular foi anulada. Nessa situação, como apresentado na (Figura V.5), foi possível reproduzir qualitativamente a alteração do potencial de Nernst do Cl^- em função da alteração da $[K^+]_o$. Porém, nas observações experimentais, a diferença do V_m (~ 0.77 mV) para a $[K^+]_o$ igual a 3 e 8,5 mM não foi estatisticamente significativa. Enquanto que, nas simulações (Figura V.5), essa diferença foi de 1.3 mV, indicando que a permeabilidade para Cl^- está relativamente alta.

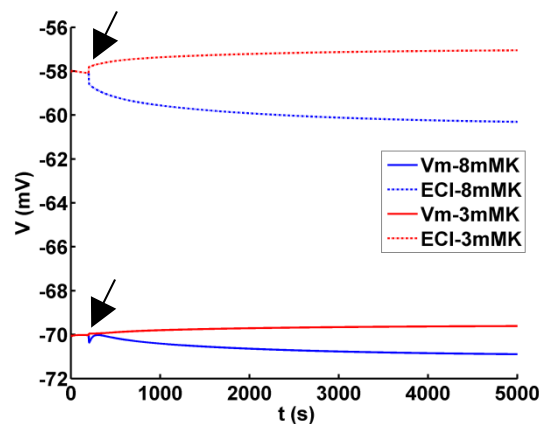


Figura V.5: Reprodução qualitativa das alterações no potencial de Nernst do Cl^- (E_{Cl}) em função de alterações na $[K^+]_o$ sob a influência da redução de 10% da permeabilidade dos sítios extracelulares para transporte de potássio, supressão de NKCC's e retirada da afinidade dos KCC's na face intracelular. As setas indicam o momento das alterações nos de K^+ .

Reduzindo a permeabilidade de Cl^- para 10% de seu valor, a diferença foi de 0.20 mV (Figura V.6).

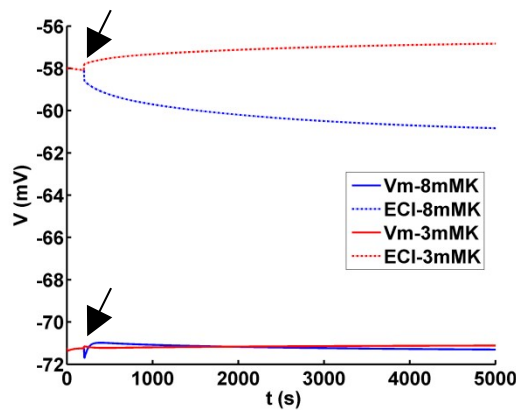


Figura V.6: Reprodução qualitativa das alterações no potencial de Nernst do Cl (E_{Cl}) em função de alterações na $[K^+]_o$ sob a influência da redução de 10% da permeabilidade dos sítios extracelulares para cotransporte de potássio e cloreto, supressão de NKCC's e retirada da afinidade dos KCC's na face intracelular. As setas indicam o momento das alterações nos de K^+ .

A diferença entre o E_{Cl} para a concentração de K^+ igual a 3 e 8,5 mM foi de 4,0 mV, sendo pequena comparada com as observações experimentais (~6,69 mV). Isso indica que a redução da concentração intracelular de Cl^- para $[K^+]_o = 8,5$ mM foi maior na manobra experimental em relação à simulação. Para aumentar a redução da concentração intracelular de Cl^- , a eficiência do KCC deve ser aumentada, por exemplo, elevando a afinidade da enzima cotransportadora para Cl^- . O aumento de 10 vezes da afinidade do KCC para o Cl^- intracelular incrementa a diferença entre os potenciais de Nernst de Cl^- para 6,6 mV, reproduzindo a manobra experimental (Figura V.6). Investigando os mecanismos envolvidos nas simulações, pode-se observar que o aumento da $[K^+]_o$ ativa a bomba de Na/K e o KCC, causando o acúmulo de K^+ intracelular e reduzindo a concentração intracelular de Cl^- . A redução da $[K^+]_o$, no sentido contrário, reduz as atividades da bomba de Na/K e do KCC, diminuindo a $[K^+]_i$ e acumulando Cl^- no meio intracelular.

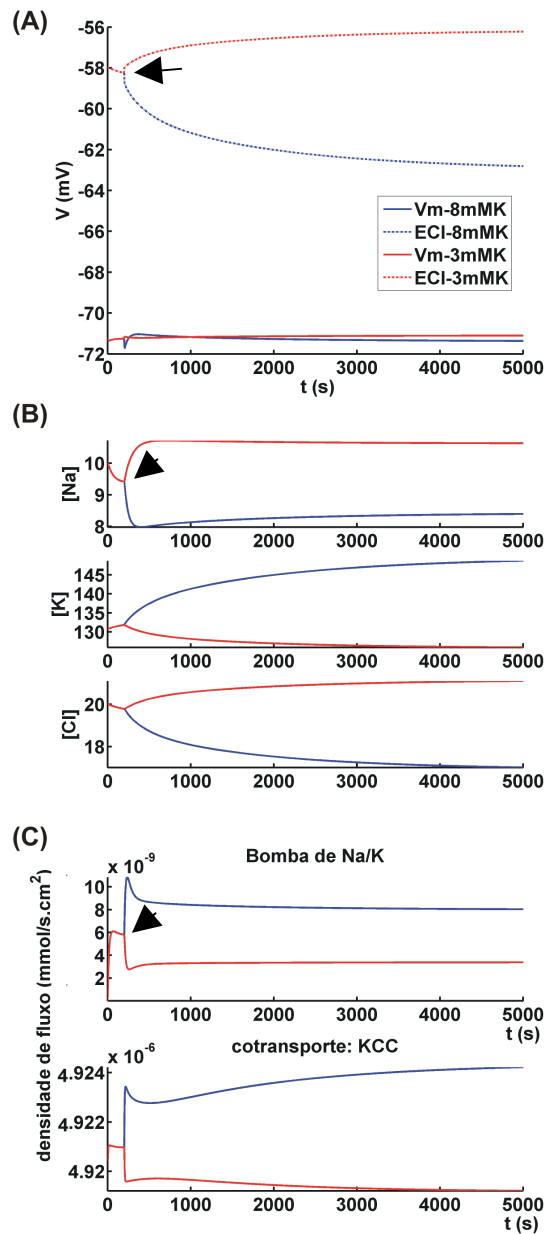


Figura V.7: Variações sofridas nos ECl- VM, nas $[K^+]_i$, $[Na^{2+}]_i$ e $[Cl^-]_i$ e, na atividade da bomba de Na^{2+}/K^+ e nos KCC's durante as modificações na $[K^+]_o$. (A) Alterações no potencial de Nernst do Cl (E_{Cl}) e no potencial de membrana (V_m) em função de alterações na $[K^+]_o$ sob a influencia do aumento de 10X da permeabilidade de cloreto na face intracelular dos KCC's. (B) Alterações sofridas pelas concentrações intracelulares de Na^{2+} , K^+ e Cl⁻. (C) Mudanças ocorridas na atividade da bomba de Na^{2+}/K^+ e nos KCC's durante as modificações na $[K^+]_o$. As setas indicam o momento das alterações nos de K^+ .

VI. DISCUSSÃO

O objetivo central da dissertação foi verificar experimentalmente as previsões feitas por simulação computacional por Almeida e colaboradores (2008), de que ao incremento de KCl extracelular corresponde um aumento de Cl^- intracelular, sendo esse um dos fatores cruciais para a deflagração das atividades espontâneas induzidas em fatias de hipocampo. Para verificar o incremento de Cl^- intracelular, optou-se por realizar medidas do potencial de Nernst de Cl^- , utilizando-se *patch-clamp* na configuração *patch* perfurado. Com o intento de garantir a concentração de Cl^- extracelular, utilizaram-se culturas de células isoladas.

A viabilidade das células mensuradas foi confirmada pelos potenciais de repouso registrados com valores similares àqueles encontrados em trabalhos como os de BALENA e colaboradores (2008) e DIYKOV E HOFFMANN (2008).

As estimativas dos potenciais de Nernst de Cl^- apontam uma tendência diferente daquela encontrada por ALMEIDA e colaboradores (2008) e BALENA e colaboradores (2009). Apesar de termos observado uma despolarização de aproximadamente 5 mV no E_{Cl^-} , em relação ao potencial de membrana, quando a $[\text{K}^+]_o$ foi aumentada para 8,5 mM, mediram-se valores mais positivos de E_{Cl^-} em relação a V_M ($E_{\text{Cl}^-} = -57,47$ mV e $V_M = -69,11$ mV) para $[\text{K}^+]_o$ igual a 3 mM.

Acredita-se que essa diferença nos valores observados seja atribuída à uma diminuição da excitabilidade neuronal, advinda das condições a que as culturas foram submetidas, sempre mantidas em um meio com $[\text{K}^+]_o$ igual a 5 mM. A manobra experimental, realizada por BALENA e colaboradores (2009), consta de aumentos sucessivos na $[\text{K}^+]_o$ durante a incubação em cultura. Esses aumentos, supomos, ao induzirem uma maior excitabilidade neuronal, permitiram que as culturas mimetizassem os diferentes estímulos que sustentam a excitabilidade neuronal, em níveis que viabilizam as mudanças neuromaturacionais. Nesse mesmo sentido, trabalhos envolvendo fatias hipocâmpais, como o de DIYKOV E HOFFMANN (2008), mostram resultados de uma circuitaria neuronal desenvolvida sob a interferência de estímulos durante o crescimento do animal. Em nosso trabalho, o tecido foi mantido em meio de cultura sem que houvesse fontes de estímulo ou indução de excitabilidade pelo meio de cultura. Há que se considerar que nessas condições, a maturação deva ter transcorrido de forma lenta, sempre seguindo o princípio de mínimo gasto energia, portanto, com baixo metabolismo. Sob tais premissas, pode-se supor uma redução da afinidade do sítio externo do KCC,

uma vez que, em se tratando de neurônios isolados, as concentrações externas permanecem constantes, conferindo total insensibilidade do meio às atividades do cotransportador. Isso leva a crer que a produção de enzimas com sítios externos deva ser naturalmente decrementada. Essa interpretação se baseia na hipótese de que as enzimas cotransportadoras possam ocorrer em duas categorias: as com sítios internos e as com externos.

Confirmando os achados do presente trabalho, LOPES (comunicação pessoal), ao investigar a indução de AENS's em cultura de fatias hipocâmpais organotípicas, em diversas faixas etárias, constatou uma ausência de AE's em fatias de duas semanas, que corresponde à faixa etária estudada no presente trabalho, quando induzidas por alta $[K^+]_o$. De acordo com MOHAJERANI e CHERUBINI (2005), em culturas observa-se um desenvolvimento neuronal mais lento que aquele ocorrido *in vivo*, em função de circunstâncias experimentais que fazem com que o tecido apresente sua expressão dos KCC2's condizentes com um tecido adulto em condições normais, mas esses cotransportadores podem estar com sua funcionalidade reduzida. No tecido *in vivo*, sob condições normais de maturação, os KCC's têm importância no transporte de K^+ e Cl^- bidirecionalmente (ALVAREZ-LEEFMANS, 2001; LAUF E ADRAGANA, 2000), sendo os KCC2's potencialmente extrusores de Cl^- em células piramidais hipocâmpais (PAYNE et al., 2003; RIVERA et al., 1999). As simulações computacionais foram realizadas aumentando a atuação dos KCC's e reduzindo a dos NKCC's, estudando, separadamente, as ativações de seus sítios internos e externos. Sob condições de menor afinidade externa do NKCC, as simulações permitem propor que o aumento na $[K^+]_o$ é responsável pelo aumento da atividade da bomba, causando um acúmulo na $[K^+]_i$, o que, por sua vez, leva ao aumento da atividade dos KCC2's e, conseqüentemente, a extrusão de Cl^- .

Diferentemente, a redução da $[K^+]_o$ de 5 para 3 mM é acompanhada de uma redução na atividade da bomba. Essa redução promove uma redução nos níveis de potássio intracelular e, conseqüentemente, uma redução da ação dos KCC2's, gerando o acúmulo de cloreto intracelular, dando origem a uma maior despolarização no potencial de Nernst desse íon.

VII. CONCLUSÕES

A relação entre o incremento de K^+ extracelular e o influxo de Cl^- , como previsto por ALMEIDA e colaboradores (2008), foi investigada utilizando-se a técnica de *patch-clamp*, na configuração *patch* perfurado. Neurônios foram investigados após duas semanas em cultura. Os resultados obtidos, aparentemente contraditórios, foram interpretados utilizando-se simulação computacional. A análise comparativa dos resultados experimentais e simulações sugerem que, nas culturas, ocorre redução importante na expressão de cotransportadores do tipo NKCC e alterações na afinidade dos KCC2's. Estes cotransportadores devem reduzir as afinidades de seus sítios extracelulares e aumentar as afinidades dos sítios internos. Isso, portanto, não traduz as mesmas condições das fatias de hipocampo de preparação aguda. Deve-se, portanto, investigar se essas alterações estimadas para os cotransportadores ocorrem, de fato, experimentalmente.

VIII. PROPOSTA PARA CONTINUAÇÃO DO TRABALHO

- Investigação da expressão dos cotransportadores KCC2 e NKCC1 em culturas de neurônios hipocâmpais.

- Investigação dos E_{Cl^-} e V_M sob diferentes níveis de K^+ extracelular em neurônios piramidais de hipocampo de ratos com idade de cultura igual ou superior a três semanas.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKEN, S.P.; BROWN, W.M. 2000, "Treatment of epilepsy: existing therapies and future developments", *Frontiers in Bioscience*, v. 5, pp. 124-152.
- AKAIKE, N., 1996, "Gramicidin perforated patch recording and intracellular chloride activity in excitable cells", *Biol.* v.65, N. 2, pp.251-264.
- ALBUQUERQUE, E.X., COSTA, A.C.S., ALKONDON, M., SHAW, K.-P., RAMOA, A.S., ARACAVA, Y. "Functional properties of the nicotinic and glutamatergic receptors", *J. Receptor Res.*, v. 11, p. 603-625, 1991.
- ALMEIDA, A.C.G., FERNANDES, V.M.F e INFANTOSI, A.F.C., 1998, "Mathematical model of the CA1 region of the rat hippocampus", *Physics in Medicine and Biology*, v. 43, pp. 2631-2646
- ALVAREZ-LEEFMANS, J.F., 2001, "Intacellular Chloride Regulation" In: *Cell Physiology Sourcebook: A molecular Approach*, 3^a. Ed. Chapter 20: 301-318.
- ANDERSEN, P., DINGLELINE, R., GJERSTAD, L., LANGMOEN, I.A., MOSFELDT LAURSEN, A.M., 1980, "Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of δ -aminobutyric acid", *J. Physiol.*, v. 305, pp. 279-296.
- ANNEGERS J.F., HAUSER WA, COAN S.P., ROCCA W.A., 1998, "A populationbased study of seizures after traumatic brain injuries." *N Engl J Med*, v. 338, pp. 20-4.
- ARGENTONI, M., Videoecefalograma nas epilepsias refratárias. In: CUKIERT, A.; Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002.

- ARROYO S., BRODIE M.J., AVANZINI G., BAUMGARTNER C., CHIRON C., DULAC O., FRENCH F.A., SERRATOSA J.M., 2002, “Is Refractory Epilepsy Preventable?” *Epilepsia*, v.43(4), pp.437–444.
- BALENA, T., ACTON, B.A., KOVAL, D., WOODIN, M.A., 2008, “Extracellular potassium regulates chloride potencial in cultured hippocampal neurons” *Brain Research*, v. 12, N. 20, pp. 11-20.
- BAUDAUF, C.M.; Estratégias Terapêuticas clínicas para o tratamento da epilepsia refratária. In: CUKIERT, A.; Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002.
- BAUDAUF, C.M.; Novas Drogas Antiepilépticas. In: CUKIERT, A.; Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002.
- BEN ARI, Y., 2001, “Developing networks play a similar melody”, *Trends Neurosci.*, v. 24, pp. 353-360.
- BEN ARI, Y., 2006, “Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture”, *Nat. Rev. Neurosc.*, v. 3, n. 9, pp. 728-739.
- BEN-ARI Y, KHALILOV I, REPRESA A, GOZLAN H., 2004, “Interneurons set the tune of developing networks”, *Trends Neurosci*, v. 27, pp. 422-427.
- BERNARD C., COSSART R., HIRSCH J. C., EXCLAPEZ M. e BEN ARI Y., 2000, “What is GABAergic inhibition? How is modified in epilepsy?”, *Epilepsia*, v. 41, pp. S90-S95.
- BIKSON M., BARABAN S.C., DURAND D.M., 2002, “Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of hippocampal slices.” *J Neurophysiol* v.87, pp.62–71.

- BANKE T.G., MCBAIN C.J., 2006, “GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development.” *J Neurosci* , v.26, pp. 11720–11725.
- CARVALHO, R.S., 2003, Transições Espontâneas de Bursts Epileptiformes para Depressão Alastrante. Dissertação de M.Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil.
- CLAYTON, G. H., OWENS, G. C., WOLF, J. S. AND SMITH, R. L., 1998, “Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex”, *Brain Res Dev*, v. 109, pp. 281-292.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981, *Epilepsia*, v. 22, pp. 489
- COSTA, J.C., A. PALMINI, E.M.T. YACUBIAN, E.A. CAVALHEIRO, ED, Fundamentos neurobiológicos das epilepsias; Lemos Editorial, São Paulo, 1998.
- DARAS, M.D.; BLADIN, P.F.; EADIE, M.J. E MILLETT, D.; Epilepsy: historical perspectives. In: Epilepsy: A comprehensive textbook. Engel Jr., J.; Pedley T.A.; 2a. edição. Wolters kluwer health, 2008.
- DEFAZIO, R.A., KEROS, S., QUICK, M.W., HABLITZ, J.J., “Potassium-Coupled Chloride Cotransport Controls Intracellular Chloride in Rat Neocortical Pyramidal Neurons”, *Journal of Neuroscience*, Vol. 21, pp. 8069–8076
- DELPIRE, E., 2000, “Cation-chloride cotransporters in neuronal communication”, *News Physiol. Sci.*, v. 15, pp. 309–312.
- DIYKOV, D., TURNCHINOVICH, A., ZOIDL, G., HOFFMANN, K.P., (2008). “Elevated intracellular chloride level in albino visual cortex neurons is mediated by Na-K-Cl co-transporter” *BMC Neuroscience*. Vol. 9, pp. 57.

- DUDEK, F.E., YASUMURA, T., RASH, J.E., 1998, “‘non-synaptic’ mechanisms in seizures and epileptogenesis”. *Cell Biology International*, v. 22, No. 11/12, 793–805
- DUDEK, F.E., SNOW, R.W. e TAYLOR, C.P., 1986, “Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts”, *Adv. Neurol.* v. 44, pp.593-617.
- EBIHARA, S., SHIRATO, K., HARATA, N., AKAIKE, N., 1995, “Gramidin-perforated patch recording: GABA response in mammalian neurones with intact intracellular chloride. *J. Physiol*”, v. 484, pp. 77-86.
- ELKIS, L.C.; Dieta Cetogênica. In: CUKIERT, A.; Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002.
- ELWES, R.D., JOHNSON, A.L., REYNOLDS, E.H., 1988, “The course of untreated Epilepsy.” *BMJ*, v.297, pp.948–50.
- ENGEL, Jr., 2008, *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Engel Jr., J.; Pedley T.A.; 2a. edição. Wolters kluwer health.
- ENGEL, J., 1989, *Seizures and Epilepsy*, 1ª ed., Philadelphia, USA, F. A. Davis Company.
- FISHER, R.S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J.Jr., 2005, “Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)”, *Epilepsia*. v. 46, pp. 470-472.
- FREEMAN, J. M., KOSSOFF, E. H., & HARTMAN, A. L., 2000, "The ketogenic diet:one decade later", *Pediatrics*, v. 3, no. 119, pp. 535-543
- FUKUDA, A., MURAMATSU, A., OKABE, A., SHIMANO, Y., HIDA, H., FUJIMOTO, I., NISHINO, H., 1998, “Changes in intracellular Ca²⁺ induced by

- GABAA receptor activation and reduction in Cl⁻ gradient in neonatal rat neocortex”, *J. Neurophysiol.*, v. 79, pp. 439-446.
- GARZON, E., JORGE, L. C., & LIBERALESSO, P. B. N. 2004, "Fenitoína. Explorando a estrutura molecular dos barbitúricos," in Tratamento Medicamentoso das Epilepsias, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 77-87.
- GOMES, M.M. Marcos históricos da neurologia, Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.
- GOMES, P.A.P. 1997, Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: Medição de [Ca²⁺] e limiar de estimulação. Tese de D. Sc., UNICAMP, Campinas, SP, MG, Brasil.
- GUERREIRO, C.A.M., GUERREIRO, M.M., F. CENDES, I. LOPES CENDES, Ed, Epilepsia (Lemos Editorial, São Paulo, 2000).
- HAMILL, O.P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F., 1981. Improved patch clamp techniques for high current resolution from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85–100
- HAUSER, W.A., 1995. “Epidemiology of epilepsy in children.” *Neurosurg. Clin.* V. 6, pp. 419–429.
- HAUSER W.A., HESDORFFER D.H., 1990, “Epilepsy: frequency, causes and consequences.” New York: Demos.
- HEINEMANN, U. e DIETZEL, I., 1984, “Extracellular potassium concentration in chronic alumina cream foci of cats”, *J. Neurophysiol.*, v. 52, pp. 421-434
- HOCHMAN, D. W., BARABAN, S. C., OWENS, J. W., et al., 1995, “Dissociation of Synchronization and Excitability in Furosemide Blockade of Epileptiform Activity”, *Science*, v. 270, pp. 99-102.

- HUANG, R. Q., BELL-HORNER, C. L., DIBAS, M. L., COVEY, D. F., DREWE, J. A., DILLON, G. H., 2001, "Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action", *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 298, pp.986–995.
- IKEDA, M., TOYODA, H., YAMANDA, J., OKABE, A., SATO, K., HOTTA, Y., FUKUDA, A., 2003, "Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl⁻ homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus", *Brain Res.* v. 984, N^o.1-2, pp. 149-159.
- ILAE 1997, "ILAE Commission report. Restrictions for children with epilepsy. Commission of Pediatrics of the ILAE. International League Against Epilepsy", *Epilepsia*, v. 38, no. 9, pp. 1054-1056.
- JEFFERYS, J.G.R., 1995, "Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions", *Physiological Reviews.* v. 75, pp. 689-723.
- JEFFERYS, J.G.R.; HAAS, H.L., 1982, "Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission", *Nature*, v. 300, pp. 448-450.
- JIN, X., HUGUENARD, J. R. e PRINCE, D. A., 2005, "Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex", *J. Neurophysiol.*, v. 93, pp. 2117-2126.
- KAILA, K. et al., 1997, "Long lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation I yramidal neurons of ra hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient", *J. Neurosci.* v. 17, pp. 7662-7672.

- KAILA, K., 1994, "Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system" *Prog. Neurobiol.*, v. 42, pp. 489-537.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSEL, T. M., 2000, *Principles of Neural Science*. Printed in the United States of American: Copyright.
- KAKAZU, Y., 2000, "Reversibility and cation selectivity of the K⁺-Cl⁻ cotransport in rat central neurons", *J. Neurophysiol.* v. 84, pp. 281-288.
- KAKAZU, Y., AKAIKE, N., KOMIYAMA, S. E NABEKURA, J., 1999. "Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J. Neurosci.* Vol. 19, pp. 2843–2851.
- KRNJEVIC K., MORRIS M.E., REIFFENSTEIN R.J., 1980, "Changes in extracellular Ca²⁺ and K⁺ activity accompanying hippocampal discharges." *Can J Physiol Pharmacol.*, v. 58, pp.570–583.
- KIRSCH, J., AND BETZ, H., 1998, "Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons." *Nature*, v. 392, pp. 717-720
- KONNERTH A, HEINEMANN U, YAARI Y. ; 1986; " Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium." *J Neurophysiol* v. 56, pp. 409–423.
- KORPI, E, R., GRÜNDER, G., LÜDDENS, H., 2002, "Drug interactions at GABAA receptors", *Progress in Neurobiology*, v. 67, 113-159.
- LAUF P.K, ADRAGNA N.C., 2000, "K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism." *Cell Physiol Biochem*, v.10, pp.341–354.
- LEINEKUGEL X, MEDINA I, KHALILOV I, BEN-ARI Y, KHAZIPOV R., 1997, "Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABAA and NMDA receptors in the neonatal hippocampus", *Neuron*, v. 18, pp. 243- 255.

- LOTURCO J.J., OWENS D.F., HEATH M.J., DAVIS M.B., KRIEGSTEIN A.R., 1995, "GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis", *Neuron*, v. 15, pp. 1287- 1298.
- LUHMANN, H. J. e PRINCE, D. A., 1991, "Postnatal maturation of the GABAergic system in neocortex" *J. Neurophysiol.*, v. 65, pp. 247-263.
- McBAIN, C.J., TRAYNELIS e DINGLELINE , 1990. "Regional variation of extracellular space in the hippocampus." *Science*, v. 249, pp. 674–677.
- McBAIN C.J., 1995. "Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy." *J. Neurophysiol.*, v.73, pp. 2853–2863.
- McNAMARA, J. O. 1994, "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy", *The Journal of Neuroscience*, v. 14, no. 6, pp. 3413-3425.
- MERCADO A., MOUNT D.B., GAMBA G., 2004, "Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters in the Central Nervous System", *Neurochemical Research*, V. 29, No. 1, pp. 17–25
- MOHAJERANI M.H. , CHERUBINI, E., 2005, "Spontaneous recurrent network activity in organotypic rat hippocampal slices." *Eur. J. Neurosci.*, v. 22, pp. 107-118
- MUSZKAT, M; RIZZUTTI, S; PEREIRA, M.M.; Epilepsias Refratárias da infância. In: CUKIERT, A.; Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002.
- NAUS, C.C.G, BECHBERGER, J.F., PAUL, D.L., 1991, "Gap junction gene expression in human seizure disorder." *Exp Neurol*, v.111:198–203.
- NEHER, E., 1981, "Íon Channels for communication between and within cells", *Physiology or Mecedine*.

- OKABE, A., YOKOKURA, M., TOYODA, H., SHIMIZU-OKABE, C., OHNO, K., SATO, K., FUKUDA, A., 2003, “Changes in chloride homeostasis-regulating gene expressions in the rat hippocampus following amygdale kindling”, *Brain Reser.*, v. 990, pp. 221-226.
- OLIVEIRA, B.L.M., PARREIRAS, M.S. DORETTO, M.C., 2007, “Epilepsia e Depressão: Falta diálogo entre a Neurologia e a Psiquiatria?”, *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, V.13, N. 3, PP.109-113
- OWENS, D.F., KRIEGSTEIN, A.R., 2003, “Is there more to GABA than synaptic inhibition?”, *Nat. Rev. Neurosc.* v. 3, pp. 715-727.
- PAN, E., STRINGER, J.L., 1996, “Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties”, *J. Neurophysiol*, v. 75, pp. 124-132
- PAPP, E., RIVERA, C., KAILA, K., FREUD, T.F., 2008, “Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia” *Neurosc.*, v. 154, pp. 677-689.
- PAYNE, J.A., RIVERA, C., VOIPIO, J., KAILA, K., 2003, “Cation-chloride cotransporters in neuronal communication, development and trauma” *Trends Neurosc.*, v. 26, pp. 199-206.
- PAYNE, J., 1997, “Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for $[K^+]_o$ regulation”, *J. Physiol Cell Physiol*, v. 273, pp. 1516-1525.
- PAYNE, J. A., STEVENSON, T.J., DONALDSON, L. F., 2003 “Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in a rat brain: a neuronal-specific isoform”, *J. Biol. Chem.* v. 271, pp. 16245- 16252.

- PEREIRA, L. S., 2005, As Conexões Sinápticas e Não-sinápticas no Hipocampo e a Propagação da Depressão Alastrante. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil.
- PERKIS, L.K., 2006, “Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices.” *Journal of Neuroscience Methods*, v. 154, pp. 1–18
- PHILLIPS, J. M., NICHOLSON, C., 1979, “Anion Permeability in Spreading Depression Investigated with Ion Sensitive Microelectrodes”, *Brain Res.*, v. 173, pp. 567-571.
- PLOTKIN, M. D., SNYDER, E. Y., HEBERT, S. C., E DELPIRE, E., 1997, “Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain”, *J. Neurobiol.*, v. 33, pp. 781-795.
- RESENDE, M.J.F., 2006, “Alterações Eletrofisiológicas, Durante Epilepsia Experimental Sustentada por Conexões Não-Sinápticas, em GiroDenteado de Ratos em Desenvolvimento.”, Dissertação de M. Sc, UFSJ, São João Del Rei, MG, Brasil.
- RIGGS, A.J., RIGGS, J.E., 2005, “Epilepsy’s role in the historical differentiation of religion, magic, and science.”, *Epilepsia*, v.46, pp.452–3.
- RIED S, HILFIKER P, MOTHERSILL I W, KRAMER G., 2000, “From clinical observation to long-term monitoring: diagnostic developments in conservative epileptology.” *Epilepsia*, 2000, v.41(Suppl 3), S2.9.
- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J.A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M., KAILA, K., ,1999, “The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation”, *Nature*. v. 397, pp. 251-255.
- RICE, M.E., NICHOLSON, C., 1988, “[Behavior of extracellular K⁺ and pH in skate \(*Raja erinacea*\) cerebellum](#)”, *Brain Research*, V.461, No. 2, pp. 328-334..

- ROPER, S.N., OBENAU, A., DUDEK, F.E., 1992, "Osmolality and nonsynaptic epileptiform bursts in rat CA1 and dentate gyrus." *Ann Neuro*, v. 31, pp.81–85.
- SANCHEZ, R.M., JENSEN, F.E., 2001, "Maturational aspects of mechanisms of epilepsy and consequences for the immature brain", *Epilepsia*, v.42, pp. 577-585.
- SHIELDS, W.D., 2000, "Catastrophic epilepsy in childhood.", *Epilepsia*, v.41(suppl 2):S2–6.
- SCHLINDWEIN - ZANINI, R., PORTUGUEZ, M.W., COSTA, J.C., 2007, "Epilepsia do lobo frontal na infância: aspectos psicológicos e neuropsicológicos", *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 17, n. 2, pp. 93-96.
- SCHWEITZER, JS., PATRYLO, PR., DUDEK, FE., 1992, "Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms.", *J Neurophysiol*, v. 68, pp.2016–2025.
- SOMJEN G.G., AITKEN P.G., GIACCHINO J.L., MCNAMARA J.O., 1985, "Sustained potential shifts and paroxysmal discharges in hippocampal formation", *J Neurophysiol* v. 53, pp.1079–1097.
- SHEN, J.M., HUGUENARD, J.R., KRIEGSTEIN, A.R., 1988, "Development of GABA responsiveness in embryonic turtle cortical neurons" *Neurosci. Lett.* v. 89, pp. 335-341.
- SOMJEN, G.G., AITKEN, P.G., GIACCHINO, J.L., MCNAMARA, J.O., 1985, "Sustained potential shifts and paroxysmal discharges in hippocampal formation" *J. Neurophysiol.* V. 53, pp. 1079-1097
- STRINGER, J.L., WILLIAMSON, J.M., LOTHMAN, E.W., 1989, "Induction of paroxysmal discharges in the dentate gyrus: frequency dependence and relationship to afterdischarge population", *J. Neurophysiol.* v. 62, pp. 126-135

- STRINGER, J.L., WILLIAMSON, J.M., LOTHMAN, E.W., 1991, "Maximal dentate activation is produced by amygdala stimulation in unanesthetized rats", *Brain Res.* V. 542, pp. 336-342
- SYKOVÁ, E., 1991, "Activity-related ionic and volume changes in neuronal microenvironment". In *Volume transmission in brain: Novel Mechanisms for neuronal transmission* (eds Fuxe K. and Agnati L. F.), pp. 217-336. Raven Press, New York.
- SYKOVÁ, E., 1992, "Ionic and volume changes in the microenvironment of nerve and receptor cells", *Progress in Sensory Physiology.* v. 13, pp. 1-167.
- TAIRA, T., LAMSA, L., E KAILA, K., 1997, "Posttetanic Excitation Mediated by GABAA Receptors in Rat CA1 Pyramidal Neurons", *J Neurophysiol*, vol. 77, pp. 2213-2218.
- TAYLOR, C. P., DUDEK, F. E., 1982 "Synchronous Neural Afterdischarges in Rat Hippocampal Slices without Active Chemical Synapses", *Science*, v. 218, pp. 810-812.
- THEODORE, W.H., FISHER, S.F., 2004, Brain stimulation for epilepsy, *The Lancet Neurology*, v. 3, No. 2, pp. 111-118.
- TRAYNELIS, S.F., DINGLELINE, R., 1989, "Role of extracellular space in hyperosmotic suppression of potassium-induced electrographic seizures", *Journal of Neurophysiology.* v. 61, 927-938.
- VAN DEN POL, A.N., GAO, X.B., PATRYLO, P.R., GHOSH, P.K. & OBRIETAN, K., 1998, "Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons.", *J. Neurosci.*, v.18, pp.10749- 10761
- VAN BREDERODE, J.F.M., TAKIGAWA, T., ALZHEIMER, C., 2001, "GABA-evoked chloride currents do not differ between dendrites and somata of rat neocortical neurons", *J. Physiol.* v. 533, pp. 711-716.

XIONG, Z. Q., STRINGER, J. L., 2000, "Sodium Pump Activity, not Glial Spatial Buffering, clears Potassium after Epileptiform Activity Induced in The Dentate Gyrus", *J. Neurophysiol.*, v. 83, pp. 1443-1451.

YACUBIAN, E. M. T. 2005, "Valproato. O amplo espectro de um solvente," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 97-113.

YAMADA J, OKABE A, TOYODA H, KILB W, LUHMANN HJ, FUKUDA A., 2004, "Cluptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurons is mediated by NKCC1", *J Physiol*, vol. 557, pp. 829-41.

ZHANG, W., LIU, L.Y., XU, T.L., 2008, "Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats", *Neuroscience*, v. 152, pp. 502-510.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)